République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945 Guelma



Faculté de Sciences de la Vie et de la Nature et de Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCE

Filière : Sciences Biologiques

Présentée par

Mme ABDAOUI Wissem

Intitulée

Caractérisation biologique et moléculaire des hémoglobinopathies dans le Nord-est Algérien

Soutenue le :09/11/2020

Devant le Jury composé de :

Mme BENJEDDOU D	Professeur	Univ. De Guelma	Président
Mr BENOUARETH D E	Professeur	Univ. de Guelma	Rapporteur
Mr DAAS T	Professeur	Univ. D'Annaba	Examinateur
Mr LADJAMA A	Professeur	Univ. D'Annaba	Examinateur
Mr JOLY Philippe	Professeur	Univ. Claude Bernard Lyon 1	Membre invité

Année Universitaire : 2019 /2020

Remerciements

Gloire et louange à DIEU, le Tout Puissant, qui m'a éclairée le bon chemin, et m'a donnée le courage et la persévérance pour l'accomplissement de ce projet, qui représente une étape conséquente dans mon parcours professionnel.

Je tiens tout d'abord à remercier mon Directeur de thèse, le Professeur D. E. BENOUARETH, qui a dirigé ce travail, ça ne sera jamais suffisant pour lui exprimer ma grande reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée pour faire avancer ce travail, pour sa patience, sa gentillesse, et son esprit responsable, critique et rigoureux. Je vous remercie vivement pour tous les jours, les mois et les années que vous avez passé à me diriger. Je vous remercie vivement pour toutes vos orientations judicieuses qui m'ont été de grande utilité ainsi que pour vos conseils précieux. Je vous remercie pour vos encouragements continus et votre soutien inestimable pendant les moments difficiles que j'ai vécus. Je vous remercie pour vos qualités scientifiques et humaines aussi, vous étiez toujours comme un vrai papa pour moi.

Je tiens également à remercier très chaleureusement Pr Philippe JOLY de m'avoir accueillie pendant trois mois dans son laboratoire de« Biochimie des pathologies érythrocytaires » au sein des Hospices Civiles de Lyon. Je vous dois le meilleur accueil que vous m'avez réservé dans votre laboratoire, et la mise à ma disposition de tous les moyens pour me permettre de réaliser mes recherches dans les meilleures conditions. Vous m'avez tant aidé et supporté au moment où j'en avais le plus besoin. Aucun mot ne pourrait exprimer mes remerciements et ma vive gratitude, et que le présent travail soit un faible témoignage de ma très haute reconnaissance et mon profond respect. Merci Phil.
Je remercie également son assistante Mme Céline RENOUX pour sa contribution inestimable au bon avancement de mes manipulations HRM.
Je remercie également toutes les techniciennes du laboratoire Joelle, Martine, Carole et Céline pour leur gentillesse et leur large disponibilité pour me faire apprendre toutes les techniques de séquençage. Je tiens à remercier les internes de pharmacie Tom et Maurine qui m'ont vraiment aidé à faire mes manip et à terminer les polymorphismes que je n'ai pas pu les faire. Ma très profonde reconnaissance va à Mme Salima AKAM pour toutes les heures, les jours et les mois que nous avons passé à travailler ensemble, pour sa simplicité et son amitié.

Mes remerciements sont adressés également aux membres du Jury qui ont pris sur leurs temps et ont bien voulu accepter de juger ce travail :

Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect au Pr. BENDJEDOU Dalila qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations. Je vous remercie également pour vos qualités professionnelles ainsi que votre bienveillance, vos qualités humaines exceptionnelles, vos conseils précieux et vos encouragements continus pour moi, tout mon respect et l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie vivement Mr A. Ladjama, Mr T. Daas, de bien vouloir accepter de juger mon travail. Veuillez accepter dans ce travail l'expression du grand respect que nous vous témoignons.

Il m'est particulièrement agréable de remercier Pr Grifi F, chef de service d'hématologie CHU Dorban Annaba d'avoir accepter de réaliser mon étude au niveau de son service et plus profondément Pr Djenouni A, professeur d'hématologie au CHU d'Annaba, pour son

orientation, sa disponibilité et son dévouement envers les patients. Sans elle, la collecte des échantillons sanguins ne seraient guère possible. Je tiens à remercier Dr Benalioua qui m'a mis en contact avec Pr Djenouni et m'a éclairé la vision sur l'impossibilité de la réalisation du recrutement à Guelma.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à Dr Gouri Adel, Maitre assistant à l'Université d'Annaba pour l'idée du thème et pour les premiers pas dans cette thèse, ses conseils pertinents, son dévouement pour la recherche scientifique et son aide dans l'analyse statistique des données de thèse.

Un grand Merci à Dr Athamenia F. Médecin épidémiologue au niveau de service de prévention à la direction de santé publique à Guelma pour son extrême aide dans l'analyse statistique des résultats obtenus durant cette étude.

Je remercie tous mes collègues et amies de près ou de loin, particulièrement, Tabet Mouna et Braik Asma pour leur extrême serviabilité et leur aide dans la réalisation de l'extraction de l'ADN et dans la rédaction du manuscrit.

Je tiens également à remercier les responsables du laboratoire Ratiba, Ghania, Hassiba, Mehdi et Leila pour leur activisme et leur disponibilité.

Je tiens aussi à remercier vivement les patients et leurs familles pour leurs disponibilités. Une pensée particulière pour tous les malades que la maladie a emportés.

En fin mes remerciements vont à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé par leurs encouragements

Dédicaces

A Mes chers magnifiques Parents, merci de m'avoir toujours soutenu tout au long de ces études et en particulier durant ces années de thèse. Merci de toujours croire en moi et de me donner autant d'amour. Cette thèse est aussi la vôtre, trouvez dans ce travail le résultat de votre soutien et d'amour… Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur ;

A mon mari, merci pour tes encouragements et ton soutien irremplaçable durant ces années de thèse. Merci de ta patience et merci de tout l'amour que tu me donnes au quotidien. Sans toi, la vie ne serait pas la même.

A Oussama et Anes, mes deux princes d'amour, merci pour votre compréhension lors de mes 3 mois de stage où j'étais absente ; Merci pour votre joie de vivre et vos sourires qui illuminent mes journées… Vous êtes le meilleur cadeau divin que j'ai reçu dans ma vie…

A Amine et Amina, merci pour tous ces moments de complicité partagés et tous les autres à venir. Vous savez combien vous comptés pour moi et à quel point je suis fière de dire que vous êtes mon frère et ma belle-sœur… Que Dieu nous garde le petit bout de chou Adam le petit cadeau du 2020…

A Salima Akam, merci pour être mon ange gardien à Lyon, de partager mon bonheur et ma douleur, de partager tous ces moments inoubliables ensemble. Mon cœur n'oubliera jamais la grande sœur que je n'ai jamais eue dans la vie…

A ma belle famille et surtout ma belle-mère… Merci pour votre amour et soutien et de votre accueil chaleureux au sein de votre famille…

A mes chères anciennes amies : Ilhem, Amel, Myriam, Faiza et Besma.
A mes chères collègues : Asma, Rym, Messouda, Mouna, Ryma, Sabrina, Hanene, Imène, Fatma.

A TOUS LES PATIENTS QUI ME SERONT CONFIES
J'espère ne jamais vous décevoir, ni trahir votre confiance.
Que Dieu nous aide à surmonter vos peines.
Que Dieu soit avec nous tous.

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des abréviations

ADN : acide Désoxyribonucléique

AHSP : α-Hemoglobin Stabilising Protein

AP2 : Activation Protein2

ALAT : Alanine aminotransférase

ASAT: Aspartate aminotransférase

A/C : hémoglobinose C hétérozygote

Ala : alanine

ARNm : acide ribonucléique messager

A/S : drépanocytose hétérozygote

A/O : hétérozygote O-arabe

C/C : hémoglobinose C homozygote

BET : Bromure d'éthidium

β-TI : Béta Thalassémie Intermédiaire

β-TM : Béta Thalassémie Majeure

CCMH: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CVO : Crise Vaso-Occulsives

CYP : Cytochrome P 450

DNase : Desoxyribonucléase

DO : Densité Optique

EDTA : Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

EKLF : Erythroïd Kruppel-Like Factor

EPO : Erythropoïétine

FAD : Flavine Adenine Dinucléotide

FOG1 : Friend of GATA-1

g/dl : gramme / Décilitre

Glu : acide glutamique

GR : Globule Rouge

GWAS: Genome World Association Study

Hb : hémoglobine

Hb A : hémoglobine A

Hb A2 : hémoglobine A2

Hb C : hémoglobine C

Hb D : hémoglobine D

Hb E : hémoglobine E

Hb F : hémoglobine foetale

Hb O-Arabe : hémoglobine O-Arabe

Hb S : hémoglobine S

HCT: Hématocrite

Hinf I : Haemophilus influenzae I

HBG1 et 2: Gènesde la gammaglobine

HMIP: Intervalle intergénique HBS1L-MYB

HRI : Heme Regulator Inhibitor

HS: Hypersensitive sites

Kb : Kilo bases

KDa : Kilo Dalton

LCR: Locus Control Region

MGG : May Grünwald Giemsa

MspI: Moraxella species I

MTHFR: Méthylène-Tétrahydro-Folate-Réductase

NF-E2 : Nuclear Factor Erythroïd 2

Oligo F: Forward primer

Oligo R: Reverse primer

O.M.S : Organisation Mondiale de la Santé

OR: Odds Ratio

Pb : Paire de base

pCO2 : la pression partielle en dioxyde de carbone

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR/RFLP : Polymerase Chain Reaction /Restriction Fragment Length Polymorphism

pH : Potentiel Hydrogène

PHHF : persistance héréditaire de l'Hémoglobine F

Pg : picogrammes

Protéinase K : Protéinase Kératine

P value : Valeur de Probabilité

SAM : S adenosyl-L méthionine

SDM : syndrome drépanocytaire majeur

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SNP: Single nucleotide polymorphism

SSA: Séquestration splénique aiguë

STA: Syndrome thoracique aigu

Taq : Thermophilus Aquaticus

TBE : Tris Borate EDTA

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

TDT : Thalassémie Dépendante des Transfusions

TDNT : Thalassémie Non-Dépendante des Transfusions

TE : Tris EDTA

VGM : Volume Globulaire Moyen

Val : valine

β –thal : Bêta-thalassémie

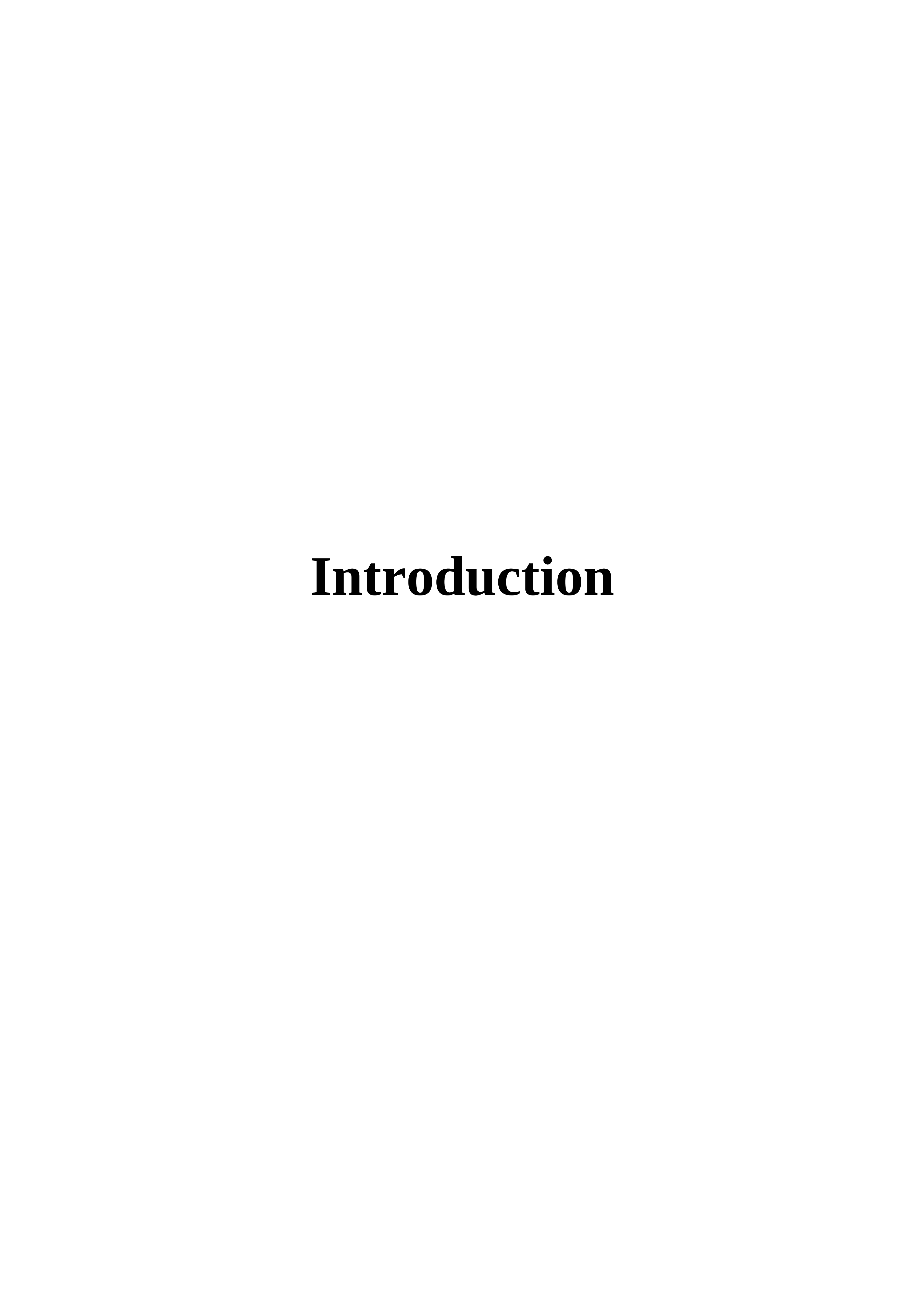
α -thal : Alpha-thalassémie

Table des matières

Chapitre 03 : Génétique de la β-thalassémie

Chapitre 4 : La drépanocytose

Discussion



Introduction

Introduction

Les hémoglobinopathies, principalement constituées par les thalassémies et la drépanocytose, sont des affections héréditaires. A l'heure actuelle, près de 5 % de la population mondiale sont porteurs d'un gène de l'hémoglobine potentiellement pathologique (il s'agit de gens en bonne santé qui n'ont hérité que d'un seul gène mutant de l'un de leurs parents). Chaque année, près de 300 000 nourrissons naissent dans le monde avec des syndromes thalassémiques (30 %) ou une anémie drépanocytaire (70 %). A l'échelle mondiale, le pourcentage de porteurs des gènes de la thalassémie est plus important que celui des porteurs des gènes de la drépanocytose, mais, du fait de la fréquence plus élevée de ce dernier gène dans certaines Régions, le nombre de naissances d'enfants atteints est plus important que pour la thalassémie **(OMS, 2006).** Dans le monde entier, les hémoglobinopathies gagnent cependant plusieurs autres pays aussi du fait de la migration des populations et du mariage consanguin. En outre, il existe des variantes d'hémoglobine, avec perturbation de la fonction de transport d'O2, qui sont présentes au sein de tous les groupes ethniques. En principe, des analyses approfondies sont réalisées en présence d'anémies microcytaires et hypochromes non ferriprives, d'anémies hémolytiques chroniques, de crises d'occlusions vasculaires d'étiologie inconnue, d'hémoglobinopathie familiale connue ou de désir d'enfants avec un partenaire atteint d'hémoglobinopathie avérée **(Aguilar-Martinez et al. 2010)**

La drépanocytose, aussi appelée anémie falciforme, est une maladie héréditaire touchant l'hémoglobine des globules rouges**.** Chez les personnes atteintes, l'hémoglobine est anormale**.** Quand la concentration en oxygène du sang diminue, elle déforme les globules rouges qui prennent alors la forme de faucilles, au lieu d'être biconcaves. Il en résulte plusieurs symptômes caractéristiques de la maladie dont les plus courants sont une anémie chronique, des crises douloureuses vaso-occlusives et une sensibilité plus importante aux infections. Cette maladie génétique est très répandue dans le monde. Apparue indépendamment en Afrique et en Inde, elle touche tout particulièrement les populations de ces régions. La drépanocytose est due à la mutation d'un gène localisé sur le chromosome 11, codant pour un des deux types de protéines qui forment l'hémoglobine : la bêta-globine. En raison de cette mutation, l'hémoglobine des drépanocytaires (dite hémoglobine S pour Sickle) a tendance à polymériser lorsque un état d'hypoxie est observé **(Aubry et al. 2014, Baudin B, 2016).**

La béta thalassémie est l'un des troubles monogéniques récessifs les plus courants dans le monde entier. Elle est caractérisée par la diminution ou l'absence totale de production de l'une des chaînes de globine normales, aboutissant à une baisse de production de l'hémoglobine (Hb) normale **(Braunstein M, 2019).** Plus de 300 allèles β-thalassémiques ont été signalés jusqu'à présent dans la base de données Hbvar (http://globin.bx.psu.edu/hbvar). Cependant ces allèles ne représentent que plus de 80% des cas dans des zones géographiques restreintes du fait d'un effet fondateur dans les populations autochtones **(Patrinos et al. 2004).** La connaissance du spectre mutationnel de la béta thalassémie est particulièrement important dans les pays où le séquençage direct de Sanger n'est pas couramment disponible et où seules des techniques plus simples tels que la PCR peuvent être utilisées pour caractériser les mutations β-thal ciblées **(Addour et al. 2008).**

Dans les pays du Maghreb, la prévalence des allèles β-thalassémiques varie de 1,5 à 4,8 % dans la population générale et est d'environ 3,0 % en Algérie **(Labie et al. 1990).** Dans ce pays, des enquêtes antérieures ont révélé une forte hétérogénéité moléculaire des mutations β-thal dues aux invasions successives et aux implantations étrangères qui caractérisent l'histoire algérienne **(Bennani et al. 1993, Bennani et al. 1996, Bouhass et al. 1994).** Cependant, ces études se sont concentrées sur Alger et non sur les provinces du nord-est de l'Algérie où l'association génétique peut être moins importante **(Addour et al.2009).** De plus, l'occurrence relative des génotypes HbS/β-thal et βS/βS (HBB : c.20A>T) chez les patients atteints de drépanocytose en Algérie n'est pas connue. Ces deux considérations sont importantes et se qualifient pour une réponse précise afin d'évaluer une stratégie documentée pour le diagnostic prénatal de l'hémoglobinopathie lors du séquençage direct de Sanger.

Chez les homozygotes β-thalassémiques, les gènes modificateurs primaires de la persistance de l'HbF comprennent les variantes génétiques capables de réduire le déséquilibre entre les chaînes α et β globine, ce qui génère une forme plus modéré de la thalassémie. Les gènes historiques sont la concurrence de α-thalassémie (α-thal), la nature des mutations β-thal ($\beta°$ ou β^+) et l'état allélique du polymorphisme de XmnI (rs7842144) dans la région du promoteur du gène HBG2, qui est associé à un niveau HbF plus élevé. Il ya dix ans, les études de l'association génomique ont identifié d'autres locus quantitatifs du HbF (QTLs de l'HbF) à l'extérieur du cluster b-globine et exactement à l'intron 2 du géne BCL11A sur le chromosome 2 et le gène de la région intergènique HBS1L-MYB (HMIP) sur le chromosome 6 **(Thein SL, 2017).**

A fin de prédire très tôt dans la vie des enfants β-thalassémique l'évolution clinique vers soit la β- thalassémie majeure ou la β- thalassémie intermédiare, un score de prédiction

de la gravité de la thalassémie (Thalassemia severity score ou TSS) utilisant ces gènes modificateurs a été mis en place **(Danjou et al. 2012, Danjou et al. 2015).** Le calcul de ce score TSS, qui peut être déterminé via un calculateur web librement disponible à travers (http://tss.unica.it/home), permet la prédication de l'âge de la première transfusion sanguine pour les patients β-thal homozygotes. Cependant, jusqu'à présent, il n'a jamais été validé sur les patients originaires du Maghreb où le spectre des mutations β-thal et le statut des gènes modificateurs des QTLs de l'HbF peut être différent de l'Italie où l'algorithme était développé et est couramment appliqué.

Le manuscrit débutera par une partie de rappels bibliographiques afin que même les lecteurs non spécialistes des hémoglobinopathies puissent lire sans difficulté la thèse. Après une présentation des généralités sur l'hémoglobine et sur les gènes de la globine et la régulation de leur transcription, l'étude des hémoglobinopathies sera abordée. Nous tâcherons d'y détailler dans le 2éme chapitre la β-thalassémie, sa classification et son diagnostic clinique, hématologique et biologique. Le 3éme chapitre de notre revue bibliographique portera sur la génétique de la β-thalassémie. Une attention particulière sera apportée sur l'étude des facteurs modulateurs d'origine génétique de la maladie influençant soit l'équilibre entre les chaines α et β ou la synthèse de l'HbF à l'âge adulte. Le dernier chapitre de la partie bibliographique portera sur la drépanocytose, sa classification et sa génétique.

Nous présenterons ensuite, dans une seconde partie méthodologique, les techniques et stratégies de génotypage et d'analyse biochimique utilisées au cours de la thèse. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus au cours de nos études et une discussion globale sera faite relativement aux apports de cette thèse et aux nouvelles questions qui en découlent en perspectives.

En Algérie, l'ensemble des études sur les hémoglobinopathies s'est concentré sur les aspects phénotypiques de l'affection, le volet moléculaire n'ayant pas fait l'objet de beaucoup de travaux à cause de l'absence des plateformes de séquençage de l'Hb **(Addour el. 2009).** Au regard de ces constats, les objectifs principaux de ce travail de thèse réalisé sur une population de 119 patients atteints d'hémoglobinopathies (60 patients β-thalassémiques et 59 patients drépanocytaires) recrutés au service d'hématologie à l'hôpital Dorban Annaba étaient les suivants :

1/ Déterminer les fréquences alléliques et le spectre des mutations β-thal chez les patients atteints d'une hémoglobinopathie (β-TM, β-TI et drépanocytose) dans trois provinces du nord-est de l'Algérie, à savoir Annaba, Guelma et Eltaref;

2/ En raison des différences de la prise en charge médicale des patients dans les trois wilayas, le deuxième objectif est d'évaluer si l'évolution clinique de la β-thalassémie dépendait ou non de la région d'origine;
3/ Evaluer pour la première fois la validité du score TSS dans une population originaire du Maghreb et étudier la corrélation entre les caractéristiques clinico-biologiques des patients et la sévérité de la maladie ;

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 :

L'hémoglobine

1. Présentation et structure de l'hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) représente le principal constituant des globules rouges. Un érythrocyte normal se compose de presque 640 millions de molécules d'Hb qui confèrent au sang sa couleur rouge et qui transporte l'oxygène des poumons vers les autres tissus **(Steiger, 2015)**.

Les hémoglobines sont des tétramères constituées de quatre chaines polypeptidiques, les chaines de globine, dont il existe plusieurs entités (leur structure primaire), et elles sont identiques deux à deux. À chaque globine est fixée une molécule d'hème qui contient un atome de fer pouvant lier une molécule d'oxygène. L'hémoglobine A (HbA), la forme majoritaire circulant dans le sang des adultes de l'espèce humaine, est constituée de deux chaines de type α et deux chaines de type β, une structure qui est résumée par l'abréviation $\alpha2\beta2$ (Figure 1). La chaine α comporte 141 résidus d'acides aminés alors que la chaine β contient 146 AA **(Schechter, 2008).**

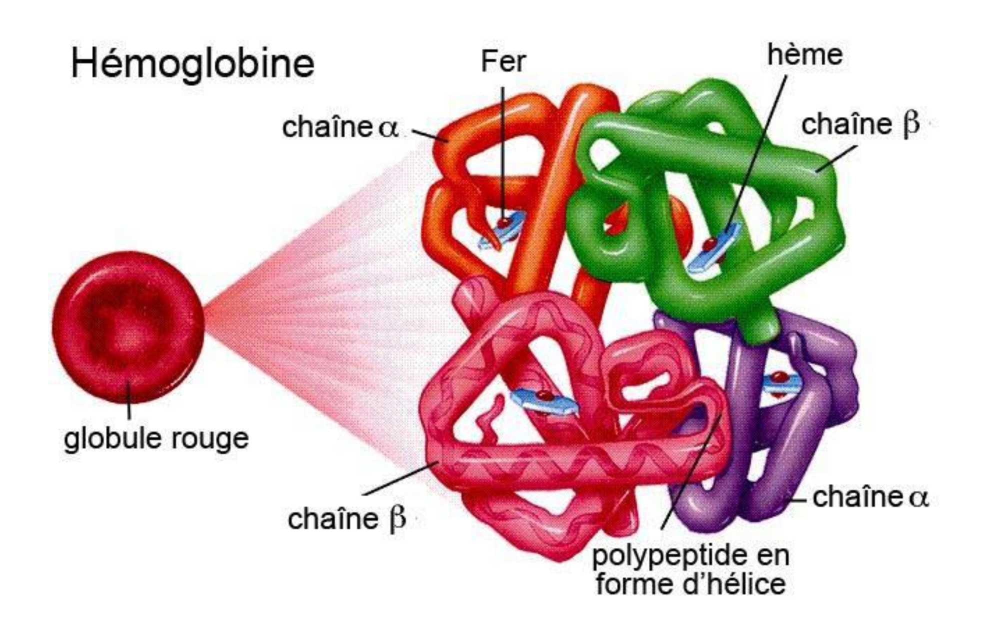


Figure 1: Représentation d'une molécule tétramérique $\alpha2\beta2$ de l'hémoglobine adulte normale (**HbA) (Weatherall et al. 1989**).

2. Rôle et évolution ontogénique des hémoglobines humaines

L'hémoglobine a un rôle physiologique essentielle dans l'organisme humain car elle fixe l'O_2 au niveau des poumons pour le transporter vers les différents tissus **(Schechter, 2008)**, en fixant quatre molécules d'O_2 par tétramère, une par groupement hème **(Murray et al.**

2010). Elle joue aussi un rôle dans le maintien du pH sanguin à 7.4 grâce à son pouvoir tampon **(Horn et al. 2005)**.

Au cours du développement ontogénique, les hémoglobines synthétisées et leur lieu d'expression varient, la structure de la protéine restant cependant toujours du même type : deux chaines de type α (ζ ou α) associées à deux chaines de types β (ε, γ, δ ou β) (Figure 2). Trois grands types d'Hb peuvent être distingués selon la composition en chaines de globines:

- L'hémoglobine embryonnaire, détectable de la 3éme semaine de gestation jusqu'à' la 10éme semaine et correspondant aux tétramères suivants : Hb Gower 1($\zeta_2\varepsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$), Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$).
- L'hémoglobine fœtale (HbF: $\alpha_2\gamma_2$), qui constitue le principal transporteur d'O_2 durant la gestation.
- L'hémoglobine adulte (HbA : $\alpha_2\beta_2$), qui remplace l'hémoglobine fœtale peu de temps après la naissance ainsi qu'un composant minoritaire adulte, l'HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$). Sous des conditions standard, les érythrocytes d'un adulte contiennent approximativement 97-98% d'HbA, 2-3% d'HbA_2 et des traces d'HbF (<1%) **(Wahed et Dasgupta, 2015 ; Couque et De Montalembert, 2013 ; Manning et *al.* 2007; Schechter, 2008).**

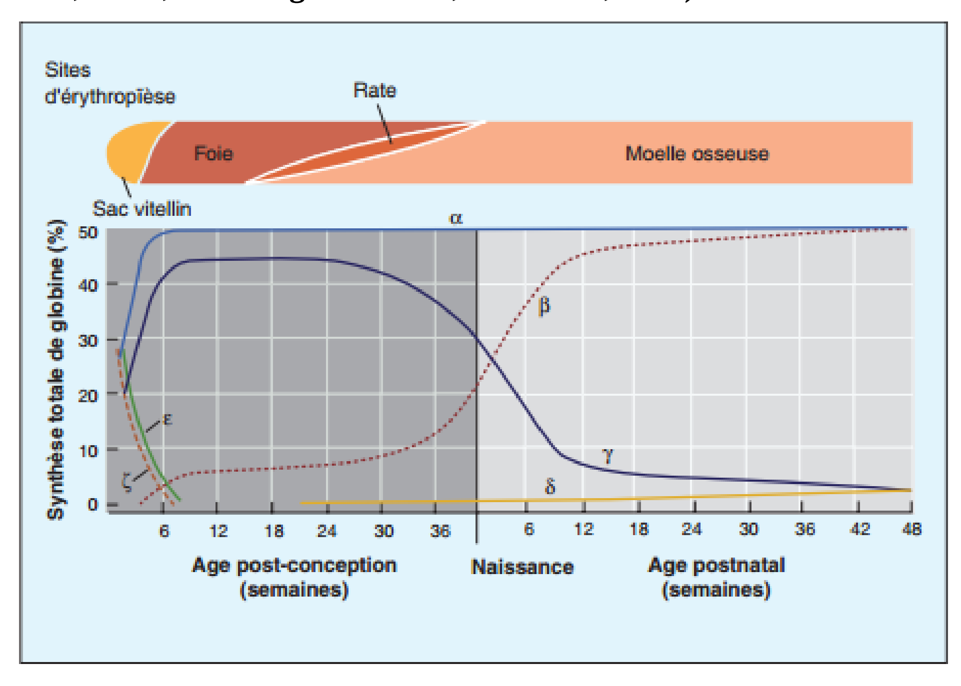


Figure 2: Sites d'érythropoïèse et expression des chaînes de globine du stade embryonnaire au stade adulte (**Joly et al. 2014**).

3. Gènes des globines

3.1. Structure et famille des gènes des globines

Les gènes de globine appartiennent à une superfamille (comprenant la myoglobine et les neuroglobines) dont tous les membres ont en commun de coder une protéine fixant l'oxygène par l'intermédiaire de l'hème. Ils ont généralement la même structure chez toutes les espèces, ils dérivent d'un ancêtre unique (il y a environ 450 millions d'années), ceci explique leur structure globale identique qui comporte 3 exons et 2 introns. L'ordre des gènes, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au sein de chaque complexe reflète l'ordre de leur expression séquentielle au cours de l'ontogénèse **(Lewin, 2004).**

Tous les différents gènes de globines sont issus de recombinaisons et/ou de duplications du gène ancestral unique. Chaque gène a ensuite pu évoluer indépendamment par des évènements de mutations ou de recombinaisons divers qui ont abouti aux variations observées entre les différents gènes **(Hardison, 2012).** Les gènes de la globine humaine sont regroupés en familles multigéniques (ou *cluster* : «agrégat »), le cluster α (ζ, α_2, α_1) et le cluster β (ε, $G\gamma$, $A\gamma$, δ, β). Ces gènes sont relativement petits, respectivement de 1.8 Kb et 1.2 Kb **(Greene *et al*. 2015).**

3.2. Localisation des gènes de l'hémoglobine

Les gènes de la famille α sont localisés près de l'extrémité télomérique du bras court du chromosome 16 (16pter), et ceux de la famille β sur l'extrémité distale du bras court du chromosome 11 (11p15.5) **(Joly *et al.* 2014)**.

3.3. La famille des gènes des chaines *β*-globine

Le cluster β-globine s'étend sur 45 Kb, il comprend 6 gènes dont 5 sont exprimés : un gène embryonnaire (ε), deux gènes foetaux (Gγ, Aγ), et deux gènes adultes (*δ* et β), et un pseudo-gène Ψβ1 dans l'ordre 5'→ 3' (Figure 3). Le gène ε le plus distal en 5', est le premier à être exprimé, durant la vie embryonnaire. Les gènes Gγ et Aγ s'expriment durant la vie foetale (HbF : $\alpha 2\gamma 2$). Leur produit ne diffère que par un seul acide aminé en position 136 sur la chaine polypeptidique, qui est une glycine dans le gène Gγ, et une alanine dans le gène Aγ. Les gènes *δ* et β sont également très homologues et ne diffèrent dans leur partie codante que par quelques nucléotides. Le pseudo-gène est localisé entre les paires Gγ/Aγ et δ/β.

La transcription globale du cluster β-globine est régulée par une région dite LCR située à l'extrémité 5' et constituée de 5 sites hypersensibles à l'ADNase I (HS1 à HS5), dont le rôle primordial a été démontré dans l'ouverture de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes au cours du développement **(Joly *et al*. 2014 ; Bonello-Palot et Badens, 2010 ; Bensimon, 1999)**.

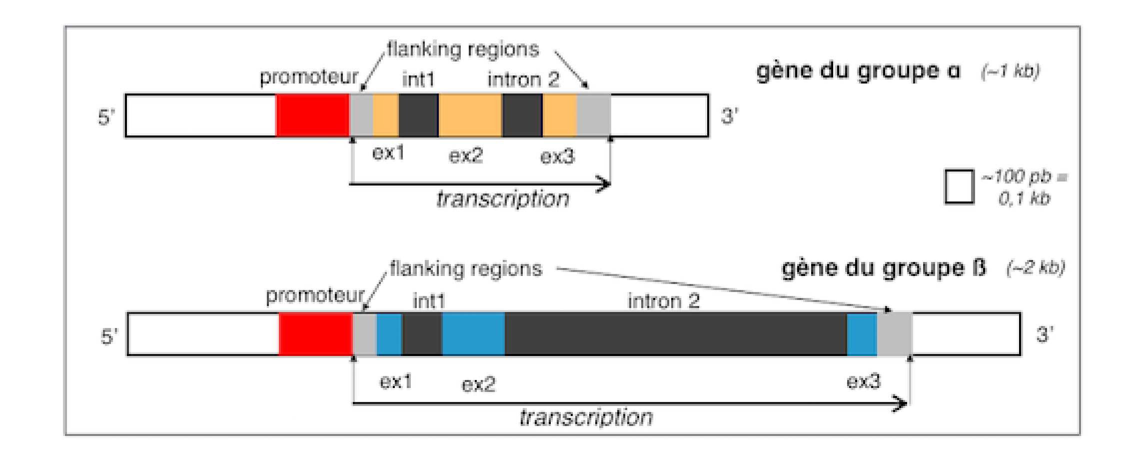


Figure 3: Le locus de la β-globine (**Kaplan et Delpech, 2007**).

4. La régulation de la transcription des gènes de la globine

La régulation de la transcription des gènes de la globine requiert trois éléments : les séquences en *cis* (promoteurs, enhancers et silencers), le β-LCR (activateur de l'ensemble du locus) et les facteurs protéiques nucléaires ou facteurs transcriptionnels érythroïde-spécifiques et ubiquitaires. L'interaction physique du LCR avec les régions promotrices via les facteurs *trans*-régulateurs est nécessaire à l'activation transcriptionnelle des gènes **(Kaplan et Delpech, 2007).**

4.1. Les séquences *cis* régulatrices

Les séquences *cis* régulatrices sont localisées au voisinage de chaque gène du locus :

4.1.1. Promoteurs

Dans le cluster β globine, chaque promoteur proximal est caractérisé par une combinaison unique de séquences d'ADN, hautement conservées pendant l'évolution, et liant différents facteurs transcriptionnels (Figure 4). Les éléments régulateurs en 5' des gènes structuraux sont la boite TATA présente dans tous les promoteurs et où se forme le complexe basal d'initiation de la transcription, les boite CACCC, CCAAT et la séquence consensus fixant le facteur érythroïde spécifique GATA -1 **(Marini *et al.* 2004).**

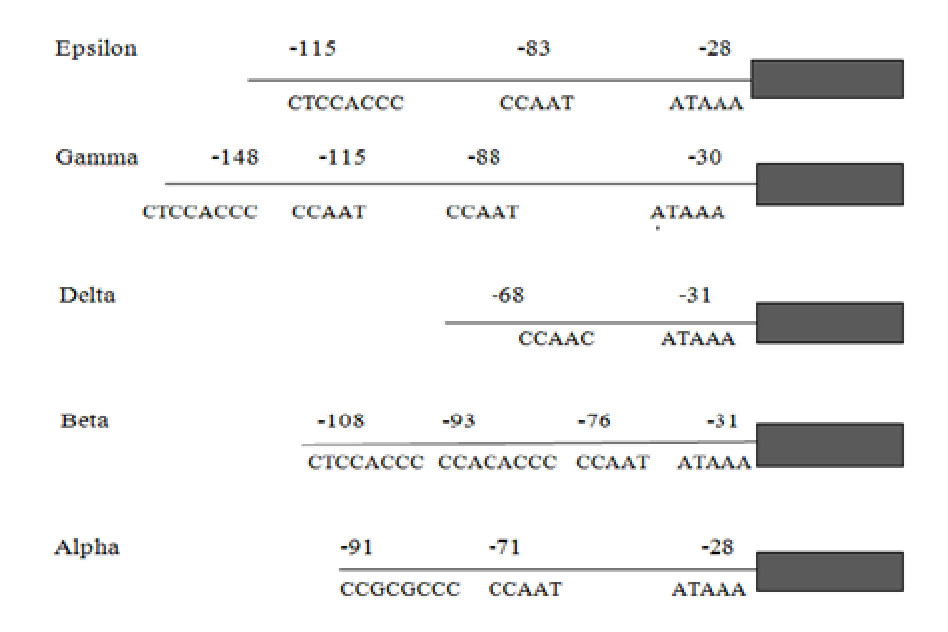


Figure 4: Les éléments structuraux appartenant aux régions promotrices des différents gènes de la globine (**Addour, 2008**).

4.1.2. Enhancers ou séquences stimulatrices

L'enhancer active la transcription d'un gène en augmentant l'affinité de l'ARN polymérase. Dans le cluster β globine, des séquences stimulatrices localisées en 3' du gène β, et une autre en 3' du gène Aγ active la transcription (Kaplan et Delpech 2007). Des sites de fixation pour des facteurs érythroïdes spécifiques (GATA-1) et ubiquitaires (AP2 et CP 1) ont été localisés **(Thein, 2005)**.

4.1.3. Silencers ou séquences extinctrices

Les séquences extinctrices sont localisées à proximité du gène ε. Une autre séquence à 0.5 Kb en amont du gène β sur laquelle se fixe le facteur BP1 (dont le gène est localisé sur le chromosome 17, serait une isoforme d'un gène homéotique impliqué dans les processus du développement) **(Thein, 2005).**

4.1.4. LCR β-globine

Le LCR β-globine est impliqué dans l'ouverture de la chromatine et jouant un rôle primordial dans le contrôle de l'expression des gènes de la famille β au cours du développement. Ainsi, l'expression érythroïde-spécifique et séquentielle des gènes résulte de l'interaction du LCR de façon spécifique avec les promoteurs individuels des gènes de globine par formation de boucles chromatiniennes complexes **(Kaplan et Delpech, 2007 ; Rund et Rachmilewitz, 2005)**. Les sites HS1 à HS4 ont une spécificité érythroïde, le site HS5 est retrouvé dans tous les tissus. En 3' du locus à environ 20 Kb en aval du gène β, un site 3'HS limite le locus qui s'étend au total sur prés de 100 Kb **(Kaplan et Delpech, 2007)**.

4.2. La régulation en trans

L'expression des gènes de la β-globine est contrôlée par deux types de facteurs : les facteurs érythroïdes spécifiques (GATA1, NF-E2, EKLF, SSP, FOG) et les facteurs ubiquitaires (YY1, Sp1, CBP, NFY ou CP1). Le facteur GATA-1 est nécessaire aux étapes tardives de la maturation érythroïde, le facteur GATA-2 est impliqué dans les étapes précoces. Le facteur EKLF se sur fixe sur les séquences CACCC, et est impliqué dans la commutation foetale → adulte **(Katsumura *et al*. 2013 ; Costello, 2009 ; Labie et Elion, 2005)**. Un des derniers facteurs de transcription découverts, BCL11A, semble avoir un rôle majeur comme répresseur de l'expression des gènes γ **(Sankaran *et al*. 2011 ; Cao et Galanello, 2010)**.

5. La régulation traductionnelle

L'initiation de la traduction peut constituer un niveau important de régulation de l'expression génique chez les eucaryotes. Ainsi l'ARNm α, produit de la transcription des deux gènes α2, α1 est en excès d'environ 40% par rapport à l'ARNm β. Pourtant la synthèse des chaines α et β de la globine est équilibrée avec un rapport de biosynthèse α/β égale à 1 (Lodish, 1976). Le processus de traduction des ARNm de globine ne peut se faire qu'en présence de quantités suffisantes d'hème. Un mécanisme est mis enjeu lorsque les quantités d'hème sont limitées.

Cette régulation est illustrée par la protéine HRI. En absence d'hème ou en présence de faibles concentrations ou alors dans des cas de déficience en fer, la protéine Kinase HR1 est activée et agit au niveau traductionnel en inhibant l'initiation de la traduction des chaines de globine par phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction EF-2. Des travaux sur des souris thalassémiques ont montré que la protéine HRI module l'accumulation de l'excès des chaines α globine et diminuerait de ce fait la sévérité de la pathologie **(Han *et al.* 2005).**

6. La régulation équilibrée des deux loci de globine

La nécessité d'un tel équilibre est attestée par la pathologie thalassémique induite en cas de déséquilibre. Une avancée importante dans la compréhension de cette coordination a été la mise en évidence d'une protéine chaperonne AHSP. Cette protéine, stabilisant spécifiquement les monomères α-Hb, est synthétisée dans les cellules érythroïdes. Lorsqu'elle rencontre un monomère β-Hb libre, le monomère α-Hb se dissocie de l'AHSP pour former un dimère αβ stable. C'est l'association des dimères qui va aboutir à la forme tétramérique fonctionnelle de l'Hb telle que l'HbA ($\alpha_2\beta_2$) **(Ribeil *et al.* 2013 ; Kaplan et Delpech, 2007)**.

7. Les hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies font partie des maladies héréditaires monogéniques les plus répandues dans le monde. Les régions les plus concernées sont les pays autour du bassin méditerranéen, le Proche-Orient, des régions d'Asie et l'Afrique occidentale. **(Steiger, 2015)**. Les hémoglobinopathies peuvent être classées en trois grandes catégories en fonction de l'anomalie qui touche l'Hb:

- **Anomalies quantitatives** : synthèse diminuée ou nulle d'une chaîne de globine entrainant ainsi des perturbations dans la synthèse de l'Hb (syndromes thalassémiques) ;
- **Anomalies qualitatives :** synthèse d'une chaine de globine structuralement anormale (Drépanocytose …).
- **Défaut de *switch* de chaines de globine après la naissance** : par exemple la persistance héréditaire de l'Hb F **(Giordano, 2013).**

Chapitre 02 :

La béta thalassémie

Chapitre 2 : la béta-thalassémie

1. Définition

Le terme «thalassémie» est dérivé des mots grecs «*Thalassa*» (mer) et «*Haema*» (sang). Il correspond à des troubles associés à la synthèse défectueuse des sous-unités de globines, α ou β de l'HbA ($\alpha_2\beta_2$) **(Eliezer et Giardina, 2011).**

Les β-thalassémies sont un groupe de troubles sanguins héréditaires caractérisés par des anomalies dans la synthèse des chaînes β de l'Hb, qui se traduisent par des phénotypes variables allant de l'anémie grave aux individus cliniquement asymptomatiques **(Alain et Marengo-Rowe, 2007).** Elles comprennent trois formes principales : la thalassémie majeure ("Anémie de Cooley" ou "Anémie méditerranéenne"), la thalassémie intermédiaire et la thalassémie mineure ("Porteurs de β-thalassémie" ou "Trait β-thalassémique" ou "β-thalassémie hétérozygote") **(Galanello et Origa, 2010).**

2. Histoire de la β-thalassémie

Quelques dates rappellent les principales étapes dans la compréhension de la maladie, dans sa description clinique et dans sa physiopathologie:

- Dans les années 1800, Von Jaksch découvre à Prague une anémie non leucémique chez un enfant de 14 mois porteur d'une splénomégalie et qui mourut avant l'âge de deux ans **(Yameogo, 2009).**
- En 1925, la thalassémie a été décrite aux Etats-Unis, à Détroit, par deux pédiatres, Cooley et Lee **(Brumpt et Pays, 1988)**. Le terme « thalassémie » fut introduit par Whipple et Brad-Ford pour désigner une anémie en 1932.
- Aux Etats-Unis, Valentine et Neel, en 1944 et 1948 ont rapproché les différentes observations des chercheurs et ont donné la description classique de thalassémie à hérédité mendélienne hétérozygote et homozygote, telle que nous la connaissons aujourd'hui.
- Haldane, en 1949 pensait que la microcytose causée par la thalassémie était bénéfique pour les gens souffrant de malnutrition ou de maladies infectieuses, comme le paludisme.
- En 1959, Ingram et Strett ont suggérèrent l'existence de deux types de thalassémies : la thalassémie α et la thalassémie β.
- Deisseroth a ensuite démontré que les gènes pour les deux types de chaînes étaient sur différents chromosomes. Fessas rapporte que ce sont les chaînes libres α ou β qui lèsent les GR et causent l'hémolyse.

Nous arrivons aux dernières années quand le repérage des gènes a permis d'explorer les cas de thalassémie non seulement au niveau des symptômes cliniques, des paramètres hématologiques, des études de familles, de la source même de la maladie : séquence et structure de l'ADN **(Lehmann, 1985).**

3. Epidémiologie

La β-thalassémie est répandue dans les pays Méditerranéens, Moyen-Orient, Asie centrale, Inde, Sud de la Chine et l'Extrême-Orient, ainsi que le long des pays de la côte nord de l'Afrique et en Amérique du Sud. La Figure 5 représente la prévalence de la maladie dans les pays de l'ancien monde.

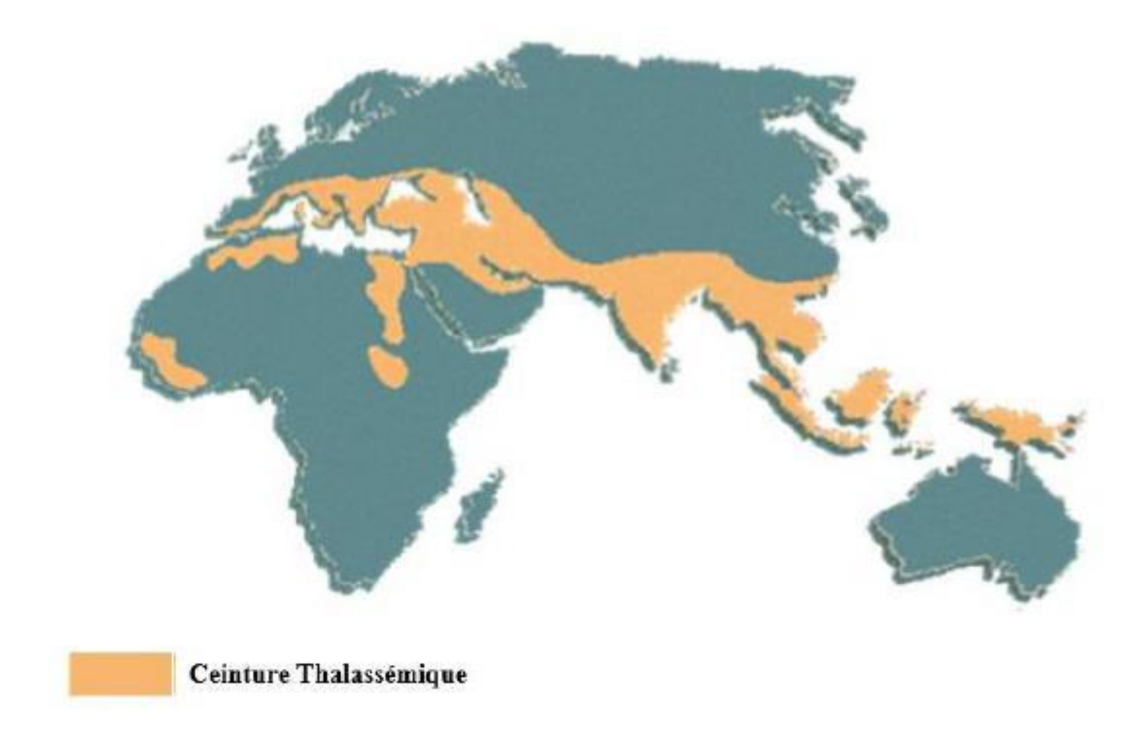


Figure 5: Répartition de la β-thalassémie dans l'ancien monde (**Lahlou, 2016**).

La fréquence la plus haute des porteurs est signalée à Chypre (14%), en Sardaigne (10,3%) et en Asie du Sud-Est. La migration de populations et le mariage mixte entre les différents groupes ethniques a introduit la thalassémie dans presque tous les pays du monde, y compris l'Europe du Nord où la thalassémie était auparavant absente. On a estimé qu'environ 1,5% de la population mondiale (80 à 90 millions de personnes) sont des porteurs de β-thalassémie, avec environ 60 000 individus symptomatiques nés chaque année. L'incidence annuelle totale des personnes symptomatiques est estimée à 1 sur 100 000 à travers le monde et 1 sur 10 000 personnes dans l'Union Européenne **(Galanello et Origa, 2010).**

En Algérie, la prévalence du trait thalassémique est variable, allant de 1.66 à 3% selon les différentes enquêtes réalisées sur plusieurs échantillons **(Addour *et al.* 2009, Belhani, 2009)**. Les approches épidémiologiques réalisées témoignent d'une augmentation de la prévalence de la maladie. En 2006, 750 patients ont été recensés et 931 en 2014, dont 56 enfants (59.7%) et 66% sont des thalassémiques majeurs **(Tensaout, 2017).**

4. Classification des syndromes β-thalassémiques

Les β-thalassémies sont réparties en trois grands syndromes selon l'importance des signes cliniques exprimés : La β-thalassémie majeure et la β-thalassémie intermédiaire, constituent les formes sévères ; La β-thalassémie mineure qui représente généralement la forme asymptomatique.

4.1. La β-thalassémie majeure (β-TM)

La β-thalassémie majeure, également nommée TDT, est la forme habituelle à l'état homozygote où il existe une suppression totale (forme β°) ou une diminution considérable (forme β^{+}) de la synthèse des chaines β de l'Hb. L'organisme réagit pour compenser le manque en augmentant la synthèse des chaines γ, ce qui aboutit a un fort pourcentage de l'HbF. Cela n'est néanmoins pas suffisant pour pallier le déficit complet d'HbA. Il en résulte alors une diminution de l'Hb totale. Les transfusions sont vitales **(Sandhya *et al.* 2013).**

4.2. La β-thalassémie intermédiaire (β-TI)

La β-TI désigne une entité clinique de gravité très variable, plus sévère que la forme mineure, mais moins sévère que la thalassémie majeure. Elle représente 5 à 10% de l'ensemble des β-thalassémies homozygotes. Sur le plan génotypique, la β-thalassémie intermédiaire est habituellement β^{+}/β^{+} ou peut être $\beta^{+}/\beta°$ **(Thuret, 2014 ; Perrimond, 2001).** Les β-TI sont également nommées les thalassémies non dépendant de la transfusion (TNDT) **(Taher *et al*. 2013).**

4.3. La β-thalassémie mineure

La β-thalassémie mineure ou hétérozygote, est due à la mutation d'un seul des deux gènes de la β-globine, l'autre gène est capable de compenser l'anomalie et produire un taux d'Hb normal ou proche de la normale. Elle est en règle asymptomatique et ne nécessite aucune prise en charge spécifique **(Desrosiers, 2003 ; Joly *et al.* 2014 ; Thuret, 2014).**

5. Complications de la β-thalassémie

Les patients atteints de β-TM nécessitent des transfusions sanguines répétées tout au long de leur vie pour survivre, celles-ci peuvent être inadéquates ou provoquant des infections, ce qui entraine de nombreuses complications : troubles cardiaques, endocriniens et hépatiques associés aux surcharges de fer et les toxicités des chélateurs de fer **(Agarwal,**

2004). La majorité des ces problèmes dépendent de l'âge. L'atteinte cardiaque est la complication la plus importante et le principal déterminant de la survie **(Dimitrios et Kremastinos, 2001).** Elle est responsable de plus de la moitié des décès, celle-ci peut prendre la forme de cardiomyopathie, hypertension pulmonaire, d'insuffisance cardiaque, d'arythmies, péricardite et de myocardite **(Sayed *et al*. 2013).** Malgré que la surcharge en fer soit la cause principale, d'autres facteurs génétiques, immunitaires ou infectieux, peuvent êtres importants. Les complications endocriniennes incluent le diabète sucré, l'hypothyroïdie, l'hypoparathyroïdie, l'hypogonadisme et la puberté retardée **(Noetzli *et al*. 2012 ; Ayfer *et al.* 2011).** Les complications les moins importantes comprennent l'atteinte hépatique, les complications neurologiques et la manifestation psychologique **(Manoj *et al*. 2013 ; Deborah et Elizer, 2005).**

6. Diagnostic biologique et clinique

6.1. Diagnostic de la β-thalassémie majeure

6.1.1. Diagnostic hématologique

L'hémogramme est marqué par une anémie sévère (Hb<7-8g/dL), qui commence dès la petite enfance, associée à une anémie microcytaire (VGM <70fL) et une hypochromie (CCMH <20pg) **(Thuret, 2014).** Le taux des réticulocytes est bas, voisin de 100 000 par mm3. Le frottis sanguin montre des anomalies érythrocytaires (anisocytose, poikilocytose, hématies à ponctuations basophiles et érythroblastose parfois très élevée, jusqu'à 100 000 éléments par mm3). La moelle osseuse est très riche en érythroblastes **(Bonello-Palot *et al*. 2016 ; Steiger, 2012).**

6.1.2. Diagnostic biochimique

L'électrophorèse de l'Hb montre que le taux de l'HbA est nul dans les formes (β^0) ou quasi-nul dans les formes (β^+), l'HbF devient donc la fraction majoritaire avec un taux supérieur à 90%, le taux d'HbA2 est normal ou augmenté **(Vinatier, 2006).** La bilirubine non conjuguée est augmentée du fait de l'hémolyse chronique. Le taux du fer est toujours augmenté, même en absence de transfusion, du fait de l'hyperabsorption intestinale du fer, secondaire à la dysérythropoïèse **(Djemaa, 2013).**

6.1.3. Diagnostic clinique

La présentation clinique de la β-TM se produit entre 6 et 24 mois. Les nourrissons atteints deviennent progressivement pâles, souffrant d'irritabilité, fièvre, diarrhée. L'élargissement progressif de l'abdomen causé par la splénohépatomégalie peut survenir mais il n'est plus observé de nos jours du fait de la prise en charge précoce par des transfusions

régulières. En l'absence de transfusion, l'espérance de vie est inférieure à 20 ans **(Bonello-Palot *et al*. 2016 ; Taher *et al.* 2008).**

6.2. Diagnostic de la β-thalassémie intermédiaire

6.2.1. Diagnostic hématologique

La numération sanguine montre une pseudo-polyglobulie associée à une anémie de sévérité variable (Hb entre 6 et 9g/dL), microcytaire (VGM entre 50 et 80fL) et hypochrome (CCMH entre 26 et 30 pg). L'hyper-réticulocytose, l'érythroblastose et la poikilocytose sont plus ou moins prononcés **(Bonello-Palot *et al*. 2016).**

6.2.2. Diagnostic biochimique

L'électrophorèse de l'Hb montre une augmentation significative du taux de l'HbF (>7-8%). Ce taux est extrêmement variable d'un patient à un autre en fonction de l'importance du déficit relatif en chaînes β-globine et il peut atteindre 60-70 % **(Joly *et al.* 2014).** Le taux d'HbA2 est anormalement élevé entre 4 et 7%, avec la présence d'HbA **(Bonello-Palot *et al*. 2016).**

6.2.3. Diagnostic clinique

Les formes de β-TI ont une sévérité qui peut être très variable mais qui ne sont pas dépendantes des transfusions ou seulement pendant certaines périodes de la vie. Certains patients, pendant leur enfance et leur adolescence peuvent évoluer vers une transfuso-dépendance totale avec l'âge. Dans ces formes atténuées, l'anémie sera plus ou moins bien tolérée. La surcharge en fer est également une complication même en l'absence de transfusion, car l'anémie chronique entraîne une augmentation de l'absorption intestinale du fer **(Bonello-Palot *et al*. 2016).**

6.3. Diagnostic de la β-thalassémie mineure

Les porteurs de la β-thalassémie mineure présentent une hypochromie et une microcytose marquées ainsi qu'une augmentation du taux d'HbA_2 (entre 3,8 et 5,5 % le plus souvent) et un taux variable d'HbF (0,5 à 4 %). Le frottis sanguin peut montrer une anisocytose et une poïkilocytose **(Joly *et al.* 2014 ; Thuret, 2014).**

7. Analyses de génétique moléculaire

La prévalence d'un nombre limité de mutations dans chaque population a considérablement facilité les tests de génétique moléculaire. Les mutations communes du gène de la β-globine sont détectées par des procédures basées sur la PCR. Les méthodes les plus couramment utilisées sont : dot-blot inverse ou l'amplification spécifique de l'amorce, avec un ensemble d'amorces complémentaires aux mutations les plus courantes dans la population d'où provient l'individu concerné **(Al Mosawy, 2017).**

8. Enquête familiale

L'enquête familiale est indispensable au diagnostic et peut révéler que les deux parents présentent une β-thalassémie hétérozygote avec à l'hémogramme une pseudo-polyglobulie microcytaire et à l'électrophorèse de l'Hb une augmentation du taux d'HbA_2> 3.3%. Ce qui définit le caractère homozygote de la β-TM **(Tensaout, 2017).**

9. Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal pour les grossesses à risque accru est possible par l'analyse de l'ADN extrait de cellules foetales obtenues par amniocentèse, habituellement réalisée environ 15 à 18 semaines de gestation ou sur des villosités choriales à 11 semaines de la gestation. L'analyse de cellules foetales dans le sang maternel et l'analyse de l'ADN foetal dans le plasma maternel peuvent également être réalisées **(Sandhya *et al*. 2013).**

Chapitre 03 :

Génétique de la β-thalassémie

1. Transmission héréditaire

La β-thalassémie se transmet selon le mode autosomique récessif. Les parents d'un enfant atteint sont obligatoirement hétérozygotes et portent une seule copie du gène muté de la β-globine. À la conception, chaque enfant issu de parents hétérozygotes a 25% de chances d'être atteint (homozygote), 50% de chances d'être porteur asymptomatique (hétérozygote) et 25% de chances d'être sain et non porteur (Figure 7). L'un des problèmes des maladies autosomiques récessives réside dans le fait que les couples à risque l'ignorent souvent, les hétérozygotes n'étant pas symptomatiques, leur statut de porteur sain n'est pas forcément connu. C'est parfois seulement à la naissance d'un enfant malade que la présence d'une mutation chez les parents est décelée **(Sandhya *et al*. 2013).**

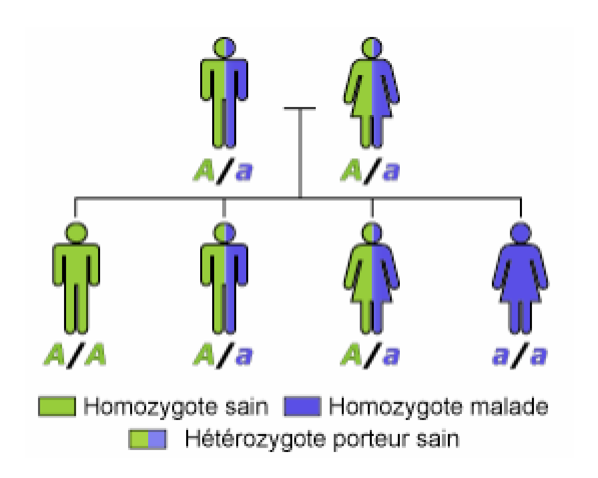


Figure 6: Mode de transmission de la β-thalassémie (**Encyclopédie Orphanet Grand Public, 2008**).

2. Bases moléculaires de la β-thalassémie

Si le tableau clinique des thalassémies est relativement homogène, les bases moléculaires en sont extrêmement variées. Plus de 300 mutations ponctuelles, rarement des délétions, affectant l'expression des gènes de globine ont été rapportées, les 3 quarts concernant le locus β-globine (Couque et *al*. 2016 ; Bonello-Palot et Badens 2010). Il est connu que la grande majorité des β-thalassémies est due à des mutations ponctuelles ou à des micro-délétions ou insertions de nucléotides. Ces mutations ont été observées sur toute l'étendue du gène β : exons, introns, promoteurs, autres régions non transcrites ou non traduites en 5' et en 3' (Figure 8). Elles ont par ailleurs été identifiées à toutes les étapes de la synthèse protéique : transcription, maturation de l'ARNm, traduction, et même pendant l'étape post-traductionnelle **(Labie et Elion, 2005).**

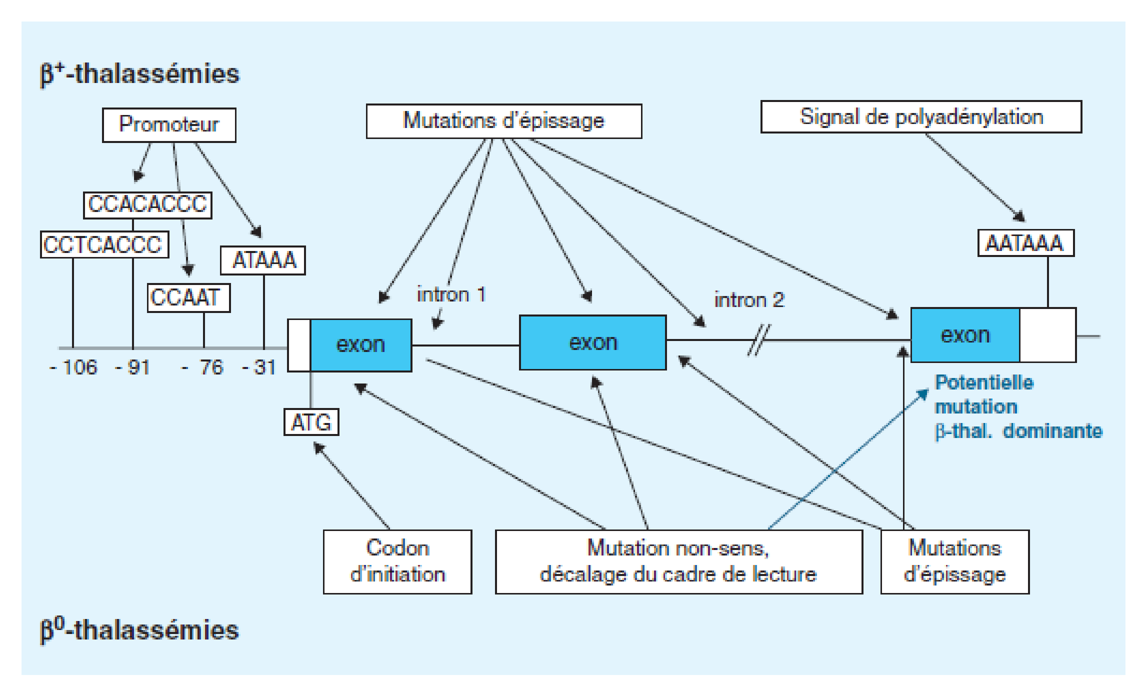


Figure 7: Les différents types de mutations β-thalassémiques (**Joly et al. 2014**).

2.1. Les mutations ponctuelles

Les anomalies les plus fréquentes dans le locus β sont les mutations ponctuelles. On distingue les mutations β^+-thalassémiques qui diminuent l'expression du gène sans l'abolir, des mutations β°-thalassémiques qui abolissent totalement l'expression du gène β-globine :

- Mutations aboutissant à une suppression totale ou presque totale de l'expression du gène (mutation β°-thalassémique). Ce sont des mutations non sens, des insertions ou délétions entraînant un décalage du cadre de lecture ou des mutations des sites d'épissage ou du codon d'initiation.
- Mutations entraînant une diminution de l'expression : certaines mutations affectent des séquences régulatrices comme les séquences conservées du promoteur (TATA box, CAAT box ou motifs CACCC) ou les séquences 5' ou 3'non traduites. D'autres créent ou activent un site alternatif d'épissage. Ce dernier type de mutation peut être localisé dans une région codante du gène et avoir donc 2 effets : un effet faux-sens qui va aboutir à la synthèse d'une chaîne de globine anormale et donc à une Hb anormale, et un effet sur l'épissage (en créant ou en activant un site cryptique d'épissage) qui conduit à une diminution du niveau de production de la chaîne protéique anormale. Il s'agit ici de variant de l'Hb à effet thalassémiant ; le plus fréquent de ces variant est l'HbE particulièrement répandue en Asie.
- Certaines mutations siégeant dans le promoteur ou dans les régions 5' et 3' non traduites ont un effet particulièrement discret sur le niveau de synthèse de la chaîne β-

globine. Chez l'hétérozygote, elles n'entraîneront aucune modification clinique ou biologique. Chez l'homozygote, elles produisent un tableau classique de trait thalassémique avec microcytose, polyglobulie et élévation de l'HbA_2. Elles ne seront réellement pathogènes qu'en association avec une mutation β°-thalassémique sur l'autre allèle et produiront un phénotype de thalassémie intermédiaire. On les appelle des mutations β-thalassémiques silencieuses ou mutations β^{++}-thalassémiques **(Bonello-Palot et Badens, 2010).**

2.2. Les formes délétionnelles

Les formes de β-thalassémies dues à des délétions sont plus rares mais pas exceptionnelles (Pissard *et al*. 2013). On distingue deux types principaux, l'un relativement fréquent et l'autre extrêmement rare :

- Délétions emportant le gène β : elles emportent soit le gène β uniquement (β0-thalassémie), soit les gènes δ et β ((δβ)°-thalassémie), soit l'intégralité du cluster β-globine ((εγδβ)°-thalassémie). Les conséquences hématologiques sont les mêmes à l'âge adulte que celles des allèles β0-thalassémique à la différence près que le taux d'HbA2 n'est pas augmenté dans les deux derniers cas. Certaines délétions qui emportent les gènes β, δ et parfois Gγ induisent une persistance de l'HbF à l'âge adulte qui atténue le phénotype δ-β-thalassémie en bloquant la commutation γ vers β qui se produit normalement entre 3 mois et 2 ans. Ce blocage est dû à la délétion de la région située entre les gènes Aγ et δ, zone de fixation de la protéine BCL11A indispensable à la répression des gènes γ de globine à l'âge adulte **(Couque *et al.* 2016 ; Sankaran *et al*. 2011).**
- Délétions emportant le LCR : il s'agit de délétions plus ou moins larges qui emportent toute ou une partie de la région qui régule la transcription de l'intégralité du cluster β-globine. Les délétions décrites au niveau de cette région semblent indiquer que c'est la région HS3 qui est primordiale pour la transcription du cluster β-globine puisque son absence est le point commun à toutes les délétions de ce type entraînant une (εγδβ)°-thalassémie **(Joly *et al*. 2011).** Au niveau hématologique, l'hypochromie et la microcytose apparaîtraient dès la vie embryonnaire puisque les gènes ε, Gγ et Aγ d'expression embryonnaire et fœtale sont également inactivés **(Couque *et al*. 2016 ; Joly *et al.* 2014).**

3. Corrélation génotype-phénotype

Il existe une corrélation assez forte entre le type de mutation β-thalassémique qui conditionne le niveau de perturbation de la synthèse de la chaîne protéique et la sévérité

clinique. L'effet d'une mutation sur le niveau d'expression du gène dépend de sa nature et de sa localisation. Les mutations β-thalassémiques sont schématiquement classées en β°, β^{+}, β^{++} ou selon un retentissement décroissant sur le niveau d'expression du gène. Les mutations localisées dans le promoteur ou dans les introns sont en principe moins délétères que les mutations non-sens ou les mutations localisées sur les sites consensus d'épissage ou encore les délétions emportant l'ensemble du gène.

En règle générale, l'hétérozygote β-thalassémique ou porteur sain n'est pas symptomatique, il présente seulement les modifications érythrocytaires typiques (pseudo-polyglobulie et microcytose) et une élévation modérée de l'HbA2. Chez l'homozygote ou l'hétérozygote composite, les 2 allèles sont mutés ; on observe alors, en fonction de la nature des mutations, un continuum de sévérité pouvant aller d'une forme intermédiaire à une forme majeure **(Bonello-Palot *et al.* 2016 ; Bonello-Palot et Badens, 2010).**

4. Les facteurs modulateurs d'origine génétique de la β-thalassémie

4.1. Facteurs influençant l'équilibre entre les chaînes α et β

Les facteurs qui influencent l'équilibre de la synthèse des chaines α et β globines sont :

- Le type de mutation dans le gène β-globine
- Une α-thalassémie associée : l'inactivation d'un ou plusieurs gènes α-globine peut corriger le déséquilibre de synthèse des chaînes de globine en normalisant le rapport α/β. La sévérité de la thalassémie est proportionnelle au niveau de déséquilibre entre les chaînes de globine **(Bonello-Palot *et al*. 2016).**
- La protéine AHSP: elle a un rôle éventuel dans la modulation de la sévérité chez le sujet β-thalassémique. Ce rôle a été suggéré, mais d'autres visant à le démontrer ont donné des résultats contradictoires **(Bonello-Palot et Badens, 2010).**

4.2. Facteurs génétiques influençant la synthèse d'HbF à l'âge adulte

La présence d'HbF dans un érythrocyte entraine une diminution de la concentration en hémoglobine pathologique, dite S. De plus, l'HbF (alpha2gamma2) et son hybride tétramère ($\alpha_2\gamma_1\beta^{S1}$) ne peuvent pénétrer dans le polymère en fibre d'HbS désoxygénée. Par leur nombre et en s'intercalant entre les acides aminés hydrophobes, elles diminuent la falciformation, et ses conséquences **(Akinsheye et al. 2011).** L'augmentation du taux d'HbF diminue la morbidité et la mortalité des patients drépanocytaires.

Les résultats des GWAS (*Genome Wide Association Studies*), menées depuis les années 2000, montrent qu'une fraction significative (20 à 50%) de la variation du taux d'HbF est due à seulement trois loci (Galarneau et al. 2010):

- le promoteur du gène de la bêta-globine,

- l'intervalle entre les gènes HBS1L et MYB,
- et le gène BCL11A.

4.2.1. Xmn1

Dans le promoteur proximal du gène de la gammaglobine HBG2 (11p15), une thymine remplace une cytosine en position -158. Cette substitution est connue sous le nom de polymorphisme Xmn1 ou rs7482144 (nom due à sa découverte, en 1985, grâce à l'endonucléase de restriction Xmn1 qui reconnait la mutation dans la séquence -157 à -166 du promoteur) **(Akinsheye et al. 2011).** Xmn1 est probablement un facteur cis-régulateur, mais son mécanisme d'action direct n'est pas établi. Il pourrait aussi être en déséquilibre de liaison avec la mutation efficace **(Labie D, 2010).**

Les drépanocytaires porteurs de ce SNP voient leur taux d'HbF multiplié par 3 à 11 (Gilman JG et Huisman TH, 1995). Xmn1 est également associé à des taux de réticulocytes et d'hémoglobine totale plus élevés. Xmn1 est retrouvé au sein des haplotypes Sénégal et Arabo-Indien. Il est associé au taux d'HbF dans des cohortes américaines (nord et sud), africaines, asiatiques et européennes **(Lettre et al. 2008).**

4.2.2. BCL11A

Le gène BCL11A, situé sur le chromosome 2p16, contient des SNP influant sur le taux d'HbF dans une séquence de 14 kilobases (kb) située dans son second intron **(Akinsheye et al. 2011).** Le marqueur retrouvé le plus corrélé dans les GWAS est le SNP rs4671393. Les polymorphismes rs10189857 et rs11886868 sont également associés de façon indépendante et forte à l'HbF dans certaines études **(Galarneau et al. 2010 ; Uda et al. 2008).**

Le gène BCL11A participe à l'inhibition de l'expression du gène de la gamma-globine. La protéine BCL11A, à l'aide de différents partenaires, forme un complexe de répression, et se lie en trans à plusieurs sites : HS3 dans le LCR (*locus control region*), la région entre les gènes gamma et delta, et le promoteur de HBG. La figure 8 montre le chromosome 11, porteur des gènes de globines epsilon, gamma, delta et bêta, et les sites de fixation de la protéine BCL11A. Par ces interactions, le gène BCL11A participe au switch gamma-beta globine (Labie D, 2010).

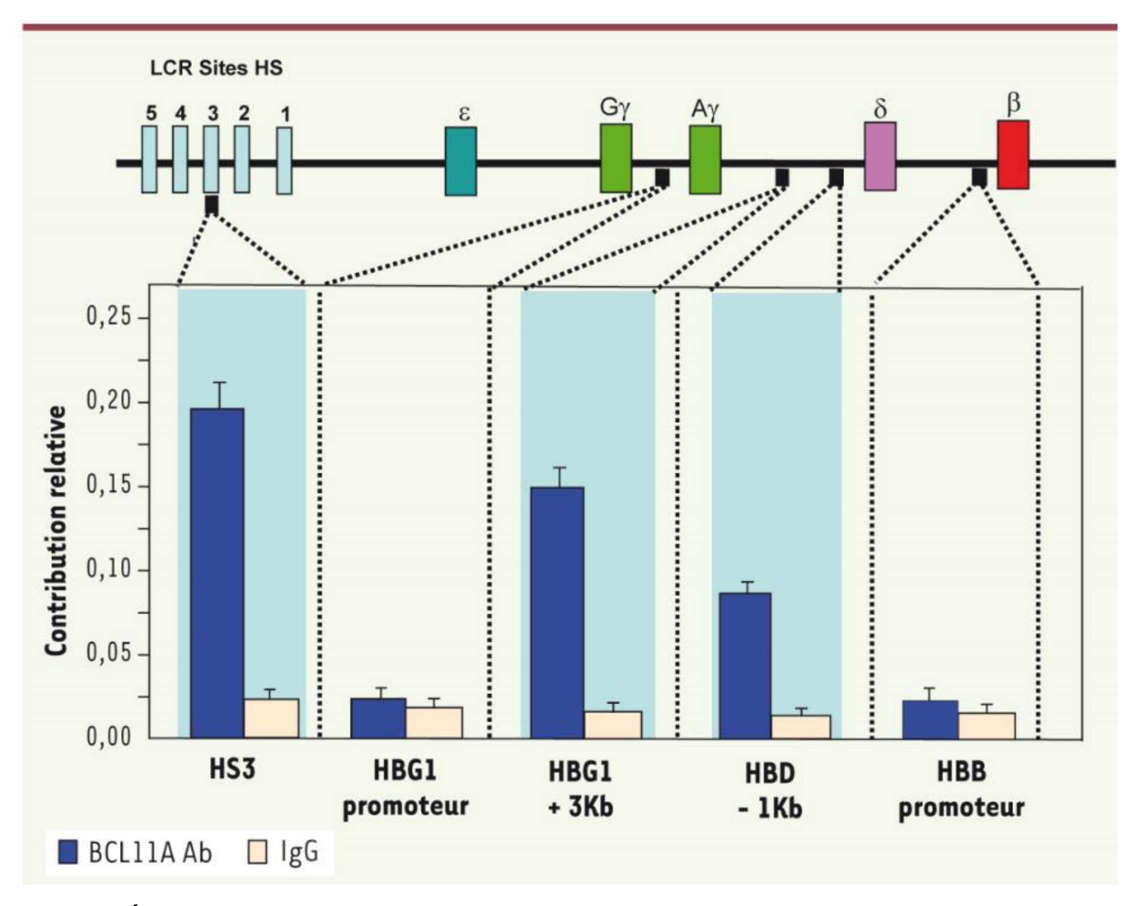


Figure 8: Étude par immuno-précipitation de chromatine de la fixation de BCL11A dans différentes régions du locus β-globine (**D. Labie, 2009**).

Les SNP situés au sein du gène BCL11A limitent probablement l'action du gène ; ils comptent pour 15 à 18% de la variation du taux d'HbF **(Akinsheye et al. 2011).** Ils sont aussi associés à une augmentation de l'hémoglobine et des leucocytes, et à une diminution des plaquettes **(Wonkam et al. 2014).** Cette association est retrouvée dans des populations asiatiques, africaines, afroaméricaines et européennes **(Lai et al. 2016 ; Wonkam et al. 2014).**

4.2.3. HBS1L-MYB

La région intergénique HBS1L-MYB est située sur le chromosome 6q23.3 et mesure 126 kb (Thein et al. 2007). Les polymorphismes responsables des variations de l'HbF sont répartis dans cette zone intergénique, non codante, en trois blocs : HMIP 1, 2 et 3 (intervalle intergénique HBS1LMYB) (Figure 9). Le bloc 2, long de 24 kb, contient les SNP les plus fortement associés aux variations de l'HbF, dont le principal représentant est rs9399137 **(Lettre et al. 2008).**

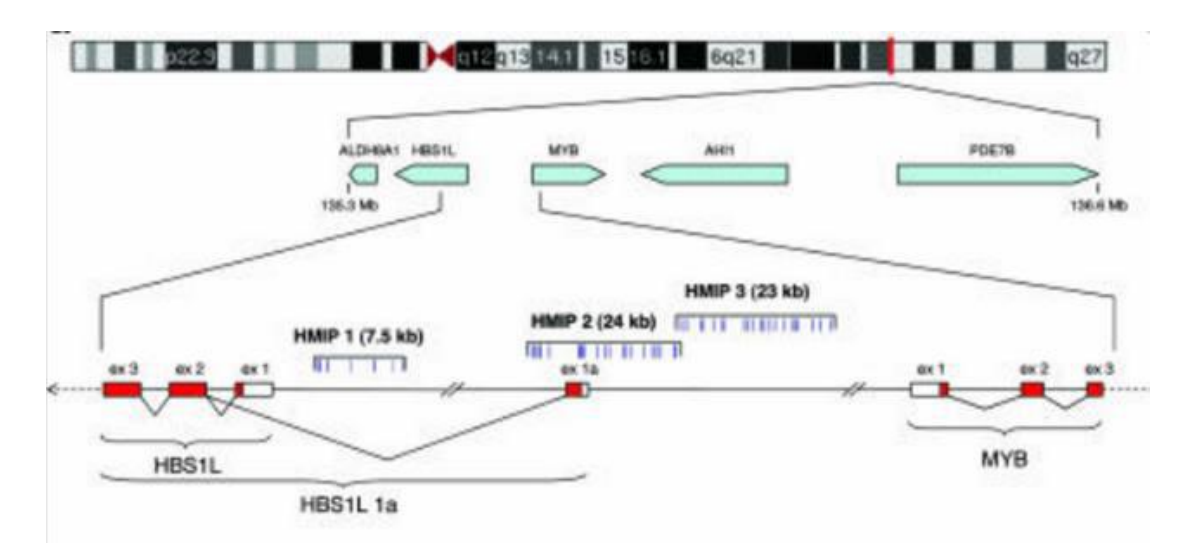


Figure 9: Organisation du segment de 126 kb d'ADN dans la région intergénique HBS1L-MYB. Les blocs contenant les SNP associés au niveau d'HbF sont HMIP 1, 2 et 3 (**Thein, 2007**).

Le gène HBS1L appartient à la famille des « GTP binding protein » qui s'expriment principalement dans le coeur et dans les muscles squelettiques, mais aussi dans les progéniteurs érythroïdes **(Stadhouders et al. 2014).**

Le gène MYB est un oncogène de la famille des facteurs de transcription myéloblastique. Il agit sur l'érythropoïèse, en contrôlant la balance différenciation / prolifération **(Stadhouders et al. 2014).** Pour cela, la protéine MYB fonctionne comme un régulateur de transcription : surexprimée, elle inhibe l'expression des gènes des gamma-globines (HBG) ; et en faible quantité, elle est associée à une diminution de la prolifération et à une accélération de la différenciation érythroïde. Les variations de MYB agissent sur le cycle cellulaire et, probablement par cet intermédiaire, sur le taux d'HbF. La protéine MYB semble également activer des gènes réprimant l'expression du gène de la gamma-globine (comme BCL11A) **(Stadhouders et al. 2014).**

L'intervalle HBS1L-MYB contient des éléments où peuvent se lier des facteurs de transcription érythroïde, qui interviennent dans la régulation de l'expression du gène MYB. Une délétion de 3 bases, rs66650371, située dans HMIP2 affecte la liaison de quatre de ces facteurs de transcription érythroïdes (GATA1, LDB1, TAL1 et KFL1), et réduit l'activation du promoteur de MYB. Elle entraine donc une accélération de la différenciation des érythrocytes, et au final une augmentation du taux d'HbF.

Ils permettent une majoration d'environ 20% du taux d'HbF, augmentent le taux d'hémoglobine et diminuent celui des plaquettes (Wonkam et al. 2014). L'association entre ces SNP et l'HbF est documentée chez des populations issues de différentes origines

géographiques et ethnies : Amérique, Europe, Afrique, Asie (Akinsheye et al. 2011). L'association de ces polymorphismes au taux d'HbF ainsi que leur fréquence varient selon les populations **(Wonkam et al. 2014).** Le mécanisme d'action de tous ces SNP, situés dans des régions du génome non codantes, n'est pas encore clairement explicité. Combinés entre eux, ils se révèlent plus fortement corrélés à l'HbF que séparément **(Galarneau et al. 2010).**

D'autres SNP semblent également associés, de façon plus rare, aux variations de l'HbF : par exemple au niveau des gènes TOX ou OR (récepteurs olfactifs), ou du promoteur du gène SAR1. La variation du taux d'HbF entre les patients est, en l'état actuel des connaissances, la principale responsable de l'hétérogénéité clinique de la maladie. Peu d'études ont lié les polymorphismes des 3 loci directement à l'expression clinique de la maladie **(Akinsheye et al. 2011).**

Chapitre 4 :

La drépanocytose

1. Présentation de la drépanocytose

La drépanocytose est une maladie génétique, transmise selon le mode autosomique récessif et est caractérisée par la présence d'hémoglobine S. Il s'agit d'une anémie hémolytique chronique provoquée par une mutation ponctuelle du gène de la globine entrainant une substitution de l'acide glutamique en position 6 sur la chaine de la bêta globine par la valine. Ceci rend l'Hb insoluble sous sa forme désoxygénée. Les chaines insolubles cristallisent dans les érythrocytes en provoquant une déformation de lame de faux (Figure 10).

On distingue cliniquement:

- La forme hétérozygote ou trait drépanocytaire qui est typiquement asymptomatique sur le plan clinique;
- Les syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) qui regroupent la forme homozygote SS et les hétérozygoties composites par association de l'hémoglobine S à d'autres hémoglobinopathies (SC, Sβ thalassémie, etc...).

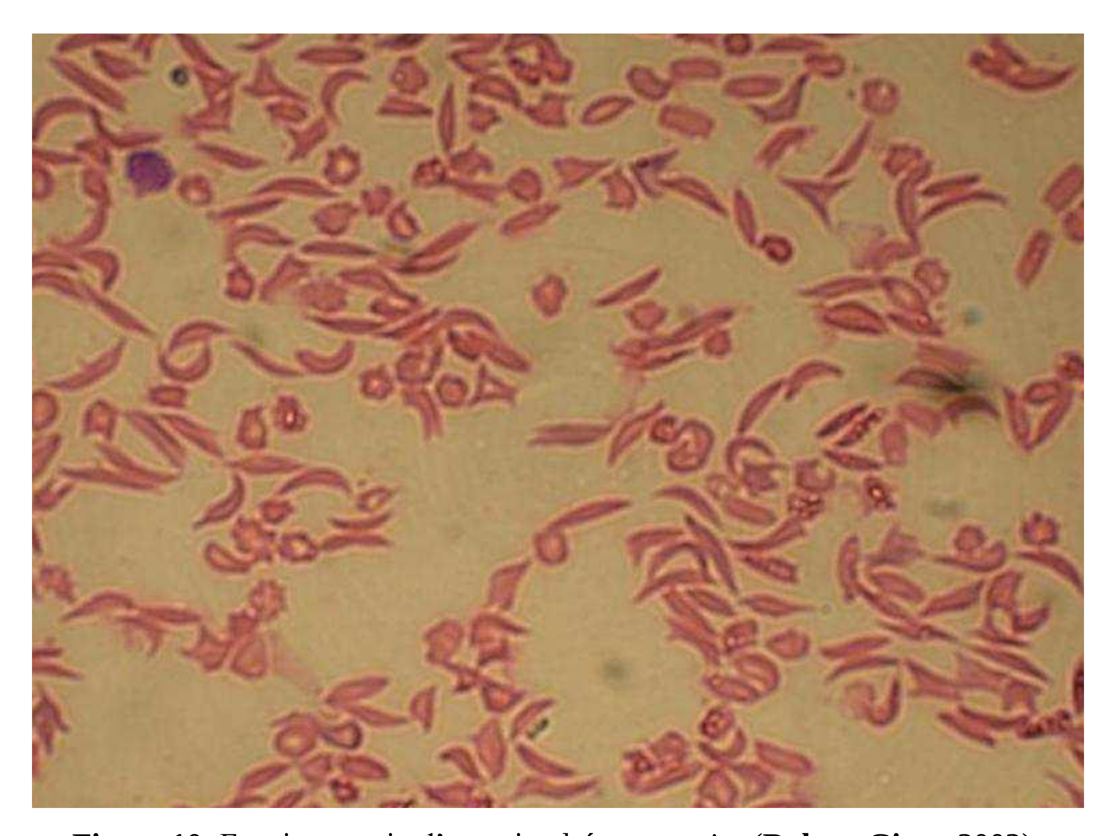


Figure 10: Frottis sanguin d'un sujet drépanocytaire (**Robert Girot, 2003**).

2. Historique

En 1904, James Herrick décrit pour la première fois cette pathologie suite à l'observation d'un frottis sanguin qui montre des hématies inhabituelles en forme de faucille ou feuille d'acanthe.

En 1949, James Neel démontre que la transmission de cette maladie est mendélienne. La drépanocytose a été la première maladie moléculaire identifiée il y'a plus de 50 ans, Pauling en, 1949, met en évidence la migration électrophorétique anormale de l'hémoglobine Hb S. Ingram en 1956, caractérise la structure primaire de la chaine d'Hb S et révèle la substitution d'un acide glutamique par une valine expliqué ultérieurement par une mutation GAG>GTG au niveau du 6ème codon du gène β-globine. Cette mutation autosomique récessive sur le chromosome 11 a été trouvé identique dans tous les cas explorés. Purtez, met en évidence, en 1950, la solubilité diminuée de l'HbS désoxygéné, puis, en 1960, la structure tridimensionnelle de l'Hb, déterminée par la cristallographie de rayon X et, enfin, celle des modifications stéréochimiques induites par la fixation, puis la libération d'oxygène **(Robert Girot, 2003).**

3. Prévalence de la drépanocytose

Chaque année, quelque 300 000 enfants naissent avec une anomalie majeure de l'hémoglobine et l'on recense plus de 200 000 cas de drépanocytose en Afrique.

La drépanocytose est particulièrement fréquente chez les personnes originaires d'Afrique subsaharienne, d'Inde, d'Arabie saoudite et de pays méditerranéens. Les migrations ont accru la fréquence du gène incriminé dans les Amériques. La prévalence du trait drépanocytaire atteint 10 à 40 % en Afrique équatoriale, alors qu'elle n'est que de 1 à 2 % sur la côte de l'Afrique du Nord et de moins de 1 % en

Afrique du Sud. Cette répartition reflète le fait que le trait drépanocytaire confère un avantage en termes de survie face au paludisme et que la pression de sélection due au paludisme a rendu le gène mutant plus fréquent, surtout dans les zones à forte transmission palustre **(OMS, 2006).**

4. Classification des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM)

4.1. Drépanocytose homozygote (malade, individu SS)

Lorsque les deux gènes sont mutés, la double mutation est donc la forme SS et représente la cause principale des SDM. L'électrophorèse de l'hémoglobine du sujet homozygote ou la chromatographie liquide mettent en évidence la présence d'HbS, d'HbF, d'HbA_2 et l'absence totale d'HbA **(Orphenet, 2011).**

4.2. Drépanocytose hétérozygote (porteur sain, individus AS)

Lorsqu'un seul des gènes β de la globine est muté sur la paire de chromosome. Les caractéristiques hématologiques du sang périphérique des patients drépanocytaires hétérozygotes sont identiques à celles du sang normal. La morphologie des hématies est

normale et il n'y a pas de drépanocytes en circulation. Cependant, l'électrophorèse de l'hémoglobine montre une fraction majeure d'HbA de 60 à 55 %, une fraction importante d'HbS de 40 à 45 % et enfin une fraction mineure d'Hb A_2 de 2 à 3 %. La drépanocytose homozygote est caractérisée quant à elle par un taux d'hémoglobine situé entre 7 et 9 g/dL **(Orphenet, 2011).**

5. Les hémoglobinopathies associées à la drépanocytose

5.1. Hétérozygote composite

Ce sont des formes où les deux gènes β de la globine n'ont pas la même mutation. Cette variation de mutations entre les deux globines est responsable de signes cliniques de sévérité variable selon les cas **(Noetzli *et al.* 2012).**

5.2. Hétérozygote composite SC

La drépanocytose composite SC représente 20% à 30% des SDM et est principalement fréquente en Afrique de l'ouest notamment au Nigeria. Elle constitue une entité autonome de la drépanocytose homozygote et résulte de l'association de deux gènes β mutés de la globine, le gène S et le gène C chez un même patient. L'hémoglobine C (HbC) est la deuxième par la fréquence des hémoglobines anormales africaines. Les individus hétérozygotes pour HbC (AC) sont asymptomatiques alors que les homozygotes pour HbC (CC) présentent le plus souvent une hémolyse compensée par une discrète splénomégalie. Chez les hétérozygotes composites SC, HbC provoque une déshydratation intracellulaire qui déclenche la précipitation de l'Hb S et donc la falciformation d'où une augmentation de la pathogénicité comparée aux hétérozygotes AS. Ces patients SC présentent des symptômes cliniques semblables à la forme SS mais avec un SDM "atténué" par rapport à la forme homozygote SS. Ainsi, leur espoir de vie est supérieure de 20 ans à celle des drépanocytaires homozygotes **(Orphanet, 2011 ; Nagel, 2003).**

5.3. Hétérozygote composite Sβ-thalassémique (Sβ)

La drépanocytose composite Sβ est le troisième SDM par sa fréquence. Elle est représentée par deux génotypes d'expression clinique très différente : la $S\beta^0$ et la $S\beta^+$. Dans la $S\beta^0$, il n'y a aucune synthèse d'HbA puisqu'aucune synthèse de globine β et le tableau clinique est proche de la drépanocytose homozygote. Dans la $S\beta^+$ on a une sécrétion d'HbA comprise entre 3% et 25 % de l'hémoglobine totale circulante (dans la forme AS l'HbA est supérieure à 50%). La sévérité clinique et biologique de la drépanocytose $S\beta^+$ est inversement proportionnelle à la quantité d'HbA présent **(Djeddi et Benameur, 2017 ; Duguelle, 2014).**

6. Physiopathologie

Première maladie moléculaire décrite en 1949, son étude a été entreprise par des abords multiples. Son mécanisme physiopathologique de base a été très précisément décrit, centré sur la polymérisation de l'Hb S désoxygénée et les déformations cellulaires subséquentes observées chez les homozygotes SS (Figure 11).

Au cours de la désoxygénation qui suit le passage dans la microcirculation, la molécule d'HbS subit un changement de conformation. Celui-ci permet à la valine β6 d'établir des liaisons hydrophobes avec la chaîne β d'une autre molécule d'Hb, en particulier avec la phénylalanine β85 et la leucine β88. Une seule des deux valines opère ce contact, de sorte que l'interaction β-β entraîne la formation d'un polymère qu'on a pu représenter comme l'enchaînement de deux rangées de molécules (Figure 11) **(Bunn, 1997).**

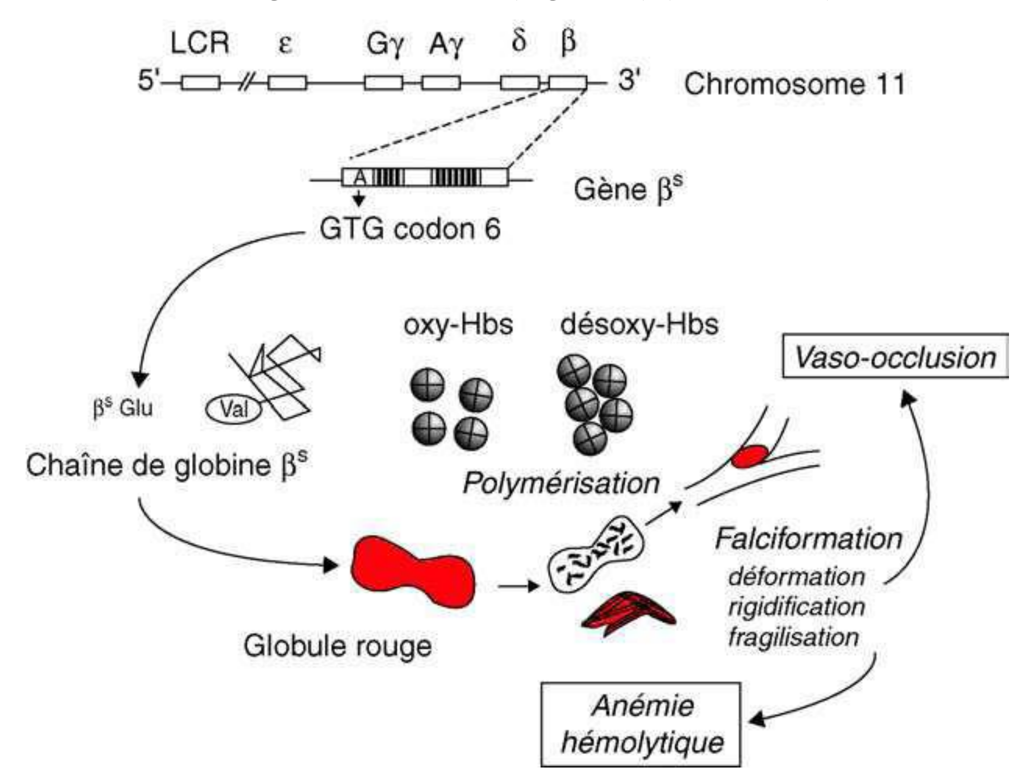


Figure 11: Mécanisme physiopathologique de base de la drépanocytose (**Labie *et al*., 2005**)

7. Génétique de la drépanocytose

7.1. Mode de transmission

La drépanocytose est une affection génétique qui se transmet selon le mode autosomique récessif, car seuls les homozygotes sont considérés comme malades.

Ainsi dans un couple de sujets hétérozygotes (AS), à chaque grossesse, la probabilité de naissance d'un enfant homozygote SS est de 25 %, celle d'un homozygote AA de 25 % et celle d'un hétérozygote AS de 50 %.

7.2. Les mutations de la drépanocytose

La drépanocytose est due à une seule mutation qui est une substitution au niveau du 6ème codon de la β-globine (Figure 12), située sur le bras court du chromosome 11, conduisant au remplacement d'une adénine par une thymine (GAG→GTG) et donc au remplacement de l'acide Glu (hydrophile) par la Val (hydrophobe). Cela se répercute sur la séquence protéique dans laquelle une globine β normale est remplacée par une globine β^s. En raison de cette mutation, l'hémoglobine des drépanocytaires est dite hémoglobine S pour sickle, et faucille en français. Cette transition de la chaine latérale apolaire à une chaine polaire modifie la configuration spatiale de la molécule d'Hb et induit des propriétés physicochimiques spécifiques de l'HbS telle que la diminution de la solubilité conduisant à une apparition d'un site hydrophobe au niveau de la globine β^s. Lorsque cette dernière est désoxygénée, elle devient un point d'ancrage d'une autre globine β^s entrainant une polymérisation de l'HbS. La mutation de la drépanocytose est parfois associée à des mutations responsables d'autres maladies de l'hémoglobine comme la β-thalassémie **(Tiendrebeogo, 2013).**

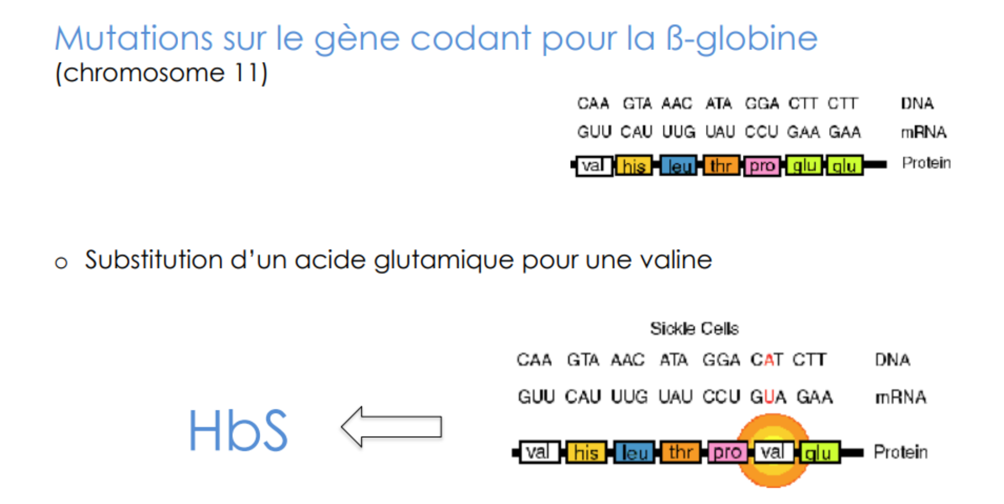


Figure 12: Mutation génétique conduisant à la drépanocytose (**Tiendrebeogo, 2013**).

8. L'effet modulateur de la drépanocytose

La drépanocytose est une maladie due à une mutation unique et qui se présente sous plusieurs phénotypes variables. L'association à une α –thalassémie diminue la concentration intraérythrocytaire d'Hb et donc la polymérisation de la
désoxy-HbS ; de même, l'Hb F forme des molécules hybrides α2βSγ qui interrompent la formation du polymère.

Les gènes γ étant proches du gène β, la question s'est posée de savoir si la variabilité de l'environnement génique de la mutation en cause pourrait participer à la variabilité d'expression de l'Hb F. Une avancée fondamentale a été, en 1978, la découverte par Kan et Dozy d'un polymorphisme de restriction (restriction fragment length polymorphism ou RFLP) affectant un site de l'enzyme *Hpa*I en aval de la
mutation βS **(Kan *et al.,* 1978).** Il s'agissait de la première description d'un polymorphisme de l'ADN humain, qui indiquait également que la mutation βS avait pu apparaître dans des contextes génétiques différents. L'identification d'autres RFLP dans le locus β-globine a ensuite permis de définir des haplotypes de restriction, souvent spécifiques d'une population, et d'établir l'origine pluricentrique de la
mutation **(Pagnier *et al.,* 1984).**

L'association statistique, entre un haplotype donné et la gravité de l'expression phénotypique est un fait d'observation. Une certaine corrélation a été trouvée, concernant en particulier la présence d'un site *Xmn*I et une expression élevée du gène Gγ **(Gilman *et al.,* 1985; Labie *et al.,* 1985).** Certaines microsatellites pourraient être le site de fixation de facteurs et intervenir dans la structure chromatinienne du locus (Labie de ces polymorphismes ont été identifiés dans la région promotrice du gène deuxième intron des gènes étendu » regroupant RFLP et microsatellites se présente dans chacun des groupes ethniques comme spécifique du chromosome porteur de la mutation intervenir dans l'expression phénotypique de la maladie **(Périchon *et al.,* 1993).**

9. Diagnostic biologique de la drépanocytose

Le diagnostic biologique peut être réalisé par plusieurs techniques:

- Le test de falciformation ou test d'Emmel: Permet de reconnaître rapidement la présence de l'HbS dans les hématies, sans toutefois différencier la forme homozygote de la forme hétérozygote.
- Le test de solubilité réduite ou test d'Itano: Consiste à mélanger un hémolysât de globules rouges avec un tampon phosphate concentré en présence d'un réducteur, l'hydrosulfate de sodium. L'apparition d'un trouble dans le milieu indique l'existence d'une Hb anormale HbS ou HbC que l'on peut par la suite différencier par centrifugation.
- Diagnostic électrophorétique: basé sur la migration des différents types d'Hb dans un champ électrique, sur un support approprié, en fonction de leur charge électrique et de leur solubilité. Le sang est prélevé sur anticoagulant et débarrassé du plasma et des

leucocytes; les globules rouges sont ensuite lysés pour obtenir une solution d'Hb libre. Plusieurs types d'électrophorèses sont utilisés: à pH alcalin, à pH acide, l'electrophorèse des chaînes de globine, l'iso-électrofocalisation et l'électrophorèse capillaire **(Tamini *et al.* 2012**

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

1. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de l'étude épidémiologique et moléculaire est de démontrer la fréquence des hémoglobinopathies (beta-thalassémie et drépanocytose) dans le nord-est de l'Algérie, la caractérisation moléculaire de mutations responsables de ces deux maladies et la corrélation entre le profil génétique et les caractéristiques épidémiologiques et clinicobiologiques des patients.

Les objectifs secondaires de notre étude sont les suivants :

1. Déterminer les fréquences alléliques, la distribution des mutations beta thalassémiques, alpha thalassemiques et des QTLs de l'HbF parmi des patients atteints dela beta thalassémie majeur, intermédiaire et de drépanocytose dans les trois wilayas de Guelma, d'Annaba et de Eltaref.
2. En vue des différences dans la prise en charge clinique et thérapeutique entre les trois wilayas Guelma, Annaba et Eltaref, une étude des paramètres clinicobiologiques des patients en fonction de la région est très demandée pour évaluer la qualité de la prise en charge des patients ainsi que l'évolution de la maladie dans chaque région.
3. Tester et Valider le score TSS (Thalassemia Severity Score) pour la première fois dans une population maghrébine après des dizaines d'années de recherche avec des cohortes uniquement européennes et corréler les différentes classes de sévérité de la beta-thalassémie en fonction des caractéristiques clinicobiologiques des patients.

2. Protocole de l'étude

2.1. Type, lieu et durée d'étude

La présente étude est une série de cas descriptive ayant porté sur 119 patients atteints chacun d'une β-thalassémie, une drépanocytose ou encore d'une association β-thalassémie-drépanocytose venant de différentes régions de l'Est Algérien (Annaba, Guelma et Eltaref). Ces patients ont été diagnostiqués et traités au service d'hématologie CHU Dorban Annaba, sur une période de 4 mois (Octobre 2017-Janvier 2018).

L'étude génétique a été réalisée au niveau de l'unité UF 34445 "Biochimie des pathologies érythrocytaires" au sein du Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand-Est, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.

2.2. Recrutement des patients

Le recrutement des patients a été réalisé durant les visites de suivi médical pour les patients drépanocytaires et lors des hospitalisations suite à des complications pour les patients thalassémiques. Les patients ainsi que leurs parents (pour les patients mineurs) ont signé un

consentement éclairé par rapport à l'utilisation de leurs matériels biologiques (prélèvements sanguins) pour des fins de recherche selon les règles d'éthique et de déontologie concernant la recherche sur des prélèvements biologiques d'origine humaine (Annexe 1).

2.3. Critères d'inclusion et d'exclusion des patients

Les critères d'inclusion des patients dans l'étude étaient l'atteinte d'une β-thalassémie, une drépanocytose, ou une association β-thalassémie-drépanocytose, et dont le diagnostic a été confirmé par un médecin hématologue suite aux résultats de l'examen clinique et d'une électrophorèse de l'Hb.

Tandis que les patients ayant bénéficié d'une transfusion remontant à une période inférieure à un mois ou bien présentant d'autres types de hémoglobinoses (HbC, HbE,..) étaient exclus de l'étude.

2.4. Analyse phénotypique des patients

Le diagnostic phénotypique de la β-thalassémie et de la drépanocytose est établi par le médecin hématologue après un examen clinique rigoureux et une analyse des paramètres hématologiques avec la numérisation de la formule sanguine (NFS) qui comporte le taux d'hémoglobine (Hb), le nombre de globule rouge par mm^3 (GR), le volume globulaire moyen (VGM), la concentration corpusculaire moyenne en hemoglobine (CCMH) et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH).

L'étape primordiale dans l'analyse phénotypique et le diagnostic de l'hémoglobinopathie est l'électrophorèse de l'Hb à pH alcalin ou l'électrophorèse capillaire (Capillarys) ainsi que le dosage de l'Hb A_2. Ces deux méthodes permettent d'analyser les fractions hémoglobiniques et identifier le caractère β^0 ou β^+ et le caractère drépanocytaire.

2.5. Recueil des données épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients

Le recueil de données a été effectué au niveau du service d'hématologie CHU Dorban Annaba pendant le recrutement des patients en se servant à un interrogatoire à fin de collecter les informations épidémiologies (âge et sexe) ainsi que la consanguinité des parents et la présence des cas similaires dans la fratrie.

Une fiche d'enquête a été remplie à partir des dossiers médicaux de chaque patient pour compléter les informations nécessaires à l'étude (Annexe 2). Les principales informations collectées à partir du dossier médical de chaque patient sont :

- Les caractéristiques épidémiologiques : Nom, prénom, âge, sexe, origine géographique, consanguinité et présence des cas similaires dans la fratrie ;

- Les renseignements cliniques: Age de découverte, antécédents pathologiques, antécédents familiaux, notion de transfusion récente ; splénectomie et âge de la splénectomie, intervalle transfusionnel et âge de la 1ére transfusion.
- Les résultats des analyses biologiques réalisées lors de la première visite de diagnostic du patient notamment le bilan hématologique : Numération formule sanguine (NFS) avec indices érythrocytaires (VGM, TCMH, CCMH) et l'électrophorèse de l'hémoglobine quelques soit sa méthode.
- Les résultats du bilan biochimique du patient pris de sa dernière visite de suivi médicale et qui comporte : ferritinémie, bilurbine directe, bilurbine totale, TGP, TGO et la sérologie du patient.
- Enquête familiale si présente (électrophorèse des parents avec l'arbre généalogique de la fratrie)

2.6. Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin a été pratiqué pour chaque patient à partir du sang veineux sous des conditions stériles et réalisé par une infirmière de service. Ce dernierest recueilli dans des tubes vacutainer de 4 ml contenant l'anticoagulant EDTA qui est un inhibiteur de l'action des enzymes ADNase ou nucléases, préservant ainsi l'intégrité moléculaire. La collecte du sang a eu lieu avant la nouvelle transfusion de routine pour avoir un délai entre transfusion et prélèvement les plus long. Tous les prélèvements sont conservés pendant une semaine au maximum à une température comprise entre 2 et 8 °C.

3. Méthodes

3.1. Extraction de l'ADN à partir des prélèvements sanguins

L'extraction de l'ADN génomique est une technique permettant d'isoler l'ADN des cellules. Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. L'extraction a été réalisée en utilisant le kit d'extraction QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, France) selon les instructions du fabricant. Il présente les avantages d'un isolement d'ADN génomique à partir du sang total ou du culot leucocytaire avec une purification rapide d'ADN de haute qualité, prêt à l'emploi avec une élimination complète des contaminants et des inhibiteurs pouvant interagir dans les étapes ultérieurs.

3.2. Détermination de la concentration d'ADN par Nanodrop

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet. Le maximum de cette absorption se situe à 260nm. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul

d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A260/A230 devrait être d'environ 2,2. Au laboratoire, le NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) est utilisé pour réaliser le dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 1µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté.

3.3. Analyse des mutations HBB par Séquençage Sanger

3.3.1. PCR pré séquençage

A. Préparation des solutions filles des amorces (Primers)

Ces solutions filles sont conventionnellement préparées au laboratoire à une concentration de 200 ng/µl (afin d'obtenir 100 ng d'amorces par tube PCR en ajoutant 0,5 µl de la solution fille) en diluant la solution mère avec de l'eau stérile.

Sur chaque tube de solution fille, on doit noter à l'aide d'une étiquette les informations suivantes : nom de l'amorce, date de préparation de la solution fille, dilution réalisée et numéro de lot de l'amorce.

B. Protocole de la Ploymerase Chain Reaction (PCR) pré séquençage

La PCR pré séquençage est une réaction de PCR ordinaire qui nécessite des amorces conçues pour étudier le gène β globine. Les amorces βr et βs sont élaborées pour amplifier l'exon 1 et 2 du gène β globine alors que les amorces P3 et H5 sont élaboré pour amplifier l'exon 3 du gène β globine. Les amorces utilisées au cours de la première PCR pré séquençage sont illustrées dans le tableau 1.

Le mix réactionnel de chaque tube de PCR est présenté dans le tableau 2 ensuite les tubes à PCR sont transférés sur un thermocycler de type Applied Biosystems ABI 9700 (Thermal Cycler, USA) et les conditions d'amplification sur thermocycler sont aussi démontrées dans le tableau 1.

Tableau 1: Amorces utilisées dans la PCR pré séquençage et dans le séquençage beta :

Amorces PCR pré séquençage	**Séquence nucléotidique (5' > 3')**	**Taille de l'amplicon**
Br	TGTACTGATGGTATGGGGC	828 pb
Bs	AAACGATCCTGAGACTTCC	
P3	TATCATGCCTCTTTGCACCATTC	661 pb
H5	GCAGCCTCACCTTCTTTCATGG	
Bin	TCTCCACATGCCCAGTTTCTA	Amorces de séquençage uniquement
Bex2	TAGAAACTGGGCATGTGGAGA	

Tableau 2: Composition du mix réactionnel pour les PCR pré séquençage

Mix PCR pour une réaction	Quantité utilisé pour chaque réactif (µl)
Gotaq G2 Cloreless HotStart	15
Amorces βr /P3	0,5
Amorces βs/H5	0,5
Eau sans nuléase	10
ADN à amplifier	4

Tableau 3: Conditions d'amplification de la PCR pré séquençage sur thermocycler Applied Biosystems

Cycles	**T°C**	**Temps**
Dénaturation initiale	95	5min
Dénaturation pour chaque cycle	95	30sec
Hybridation	62	30sec
Elongation	72	1min
Elongation Finale	72	5min
Nombre de cycle	32	

C. Purification des produits PCR

Une purification au préalable est réalisée avant la lecture sur le Labship GX sur des plaques nucleofast 96-well, Macherey-Nagel et elle est réalisée selon le protocole suivant : Un volume de 25 µl du produit de PCR est transféré sur des plaques blanches auquel est rajouté un volume de 75 µl d'eau stérile. La plaque est placée dans un appareil qui réalise une aspiration sous vide. 60 µl d'eau est ajouté à nouveau à la plaque et une aspiration sous vide est encore réalisée. 60 µl d'eau stérile est rajouté et la plaque est montée sur un agitateur de plaque pendant 10 minutes pour récupérer le produit purifié dans une barrette.

C. Lecture de la PCR sur LabShip GX

Un volume de 25 µl du produit PCR purifié est déposé sur des plaques transparentes 96-well PCR Plate dédié à la lecture dans le LabShip GX (PerkinElmer Inc, USA). Une centrifugation rapide est réalisée avant d'éliminer les bulles d'air avant la placer dans le LabChip GX afin de visualiser les bandes des produits PCR.

3.3.2. Séquençage selon Sanger

Le séquençage du gène beta globine a été réalisé selon la méthode de Sanger modifié (Clark et al,. 2017), en utilisant le kit Big Dye Xterminator 1.1 kit de séquençage de cycle (Applied Biosystems, Bouartaboeuf, France). Le séquenceur utilisé est l'analyseur génétique ABI PRISM 3130 XL (Thermofischer scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) selon les recommandations du fabricateur.

a. Principe de la méthode de Sanger

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des différents nucléotides. Il s'agit d'une amplification classique de l'ADN avec cependant une différence qui consiste à rajouter dans le mélange réactionnel de PCR, des didésoxynucléotides tri-phosphates (ddNTP) : ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP marqués chacun par un fluorochrome différent. L'incorporation de ces ddNTP empêche l'ajout du prochain désoxynucléotide tri-phosphate (dNTP) habituel. Ainsi, les dNTP et les ddNTP sont incorporés de façon aléatoire lors de l'amplification. Des fragments de taille variable seront obtenus et seront analysés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur (Figure 13).

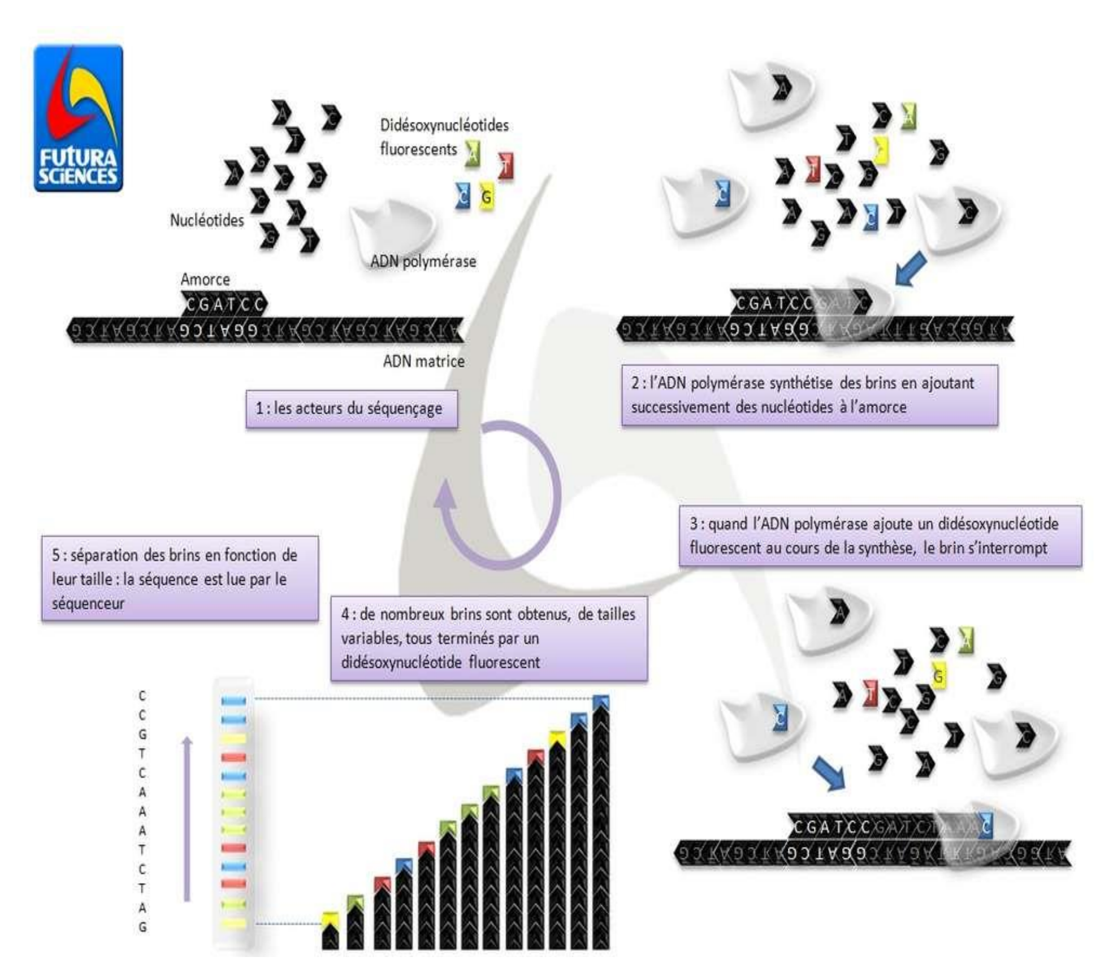


Figure 13: Séquençage selon Sanger (**Renoux C, 2018**).

La technologie Big Dye Terminator_version2 (Applied Biosystems : ABI) a été utilisée. Cette dernière utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluoréscéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (Rhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur. Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

B. Mode opératoire

Chaque barrette de séquençages utilisée contient 8puits et chaque réaction de séquençage β contient 6amorces donc on doit calculer le nombre total des barrettes utilisées. On commence par le vortex des produits de PCR pré séquençage et on prépare les dilutions

des solutions filles des 6 amorces utilisées (βr, βin1down, βEx2, βs, P3 et H5) cités précédemment dans la PCR pré séquençage.

Tableau 4: Composition du mix réactionnel pour la PCR du Séquençage Beta.

Mix PCR pour une réaction	Quantité utilisé pour chaque réactif (ul)
Eau nuclease free	5.75
Big Dye 1.1	1.75
Tampon 5X	0.6
Amorces	1
ADN à amplifier	1

-on prépare le mix réactionnel selon le tableau X et on dépose 8ul du mix dans chaque cupule de barrette et on ajoute ensuite 1ul des amorces et 1ul de produit de PCR pré séquençage purifié avec des mouvements va et viens et on doit changer les embouts à chaque fois.

- Boucher avec des bouchons à barrette, numéroter les bouchons et les barrettes. Vortexer et centrifuger.

-Placer les barrettes dans les thermocyclers post PCR selon les conditons d'amplifications

Tableau 5: Conditions d'amplification sur Thermocycler post PCR.

Cycles	**T°C**	**Temps**
Dénaturation initiale	96	1min
Dénaturation pour chaque cycle	96	10sec
Elongation	60	4min
Nombre de cycle	30	

Après 2H30 d'amplification sur thermocycler, on doit réalise une purification des séquences obtenues avec le kit Big Dye Xterminator.

C. Purification de la réaction de séquence avec le Kit Big Dye-XTerminator

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules

chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par électrophorèse capillaire. Le kit contient :

- un flacon —SAM Solution (stockage à T° ambiante)

- un flacon : « XTerminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler)

1. Préparer un mix contenant : 45 µl de solution SAM par puits 10 µl de la solution de Big Dye XTerminator par puits à l'aide des cônes spécifiques. - Vortexer 10 sec le flacon XTerminator Solution et prélever immédiatement la quantité nécessaire.
2. Vortexer le mélange et ajouter 55µl dans chaque puits des barettes de séquençage à l'aide de la pipette multicanaux.
3. Sceller la plaque correctement avec un film adhésif
4. Mettre la plaque sur l'agitateur à plaques IKAvortex Genius.
5. Agiter à 1800 rpm pendant 30 minutes.
6. Centrifuger la plaque 2 minutes à 1000 g (Centrifugeuse Heraus Multifuge 3S-R). Les plaques sont prêtes pour être analysées par le séquenceur génétique Applied 3331 XL.

D. Lecture des séquences par le Logiciel SeqScape 3

L'analyse des séquences obtenues avec le séquenceur Applied 3130 XL est réalisée par le logiciel SeqScape 3.0 (Applied Systems, CA, USA). Une séquence de référence du gène HUMHBB est importée à partir du GenBank sur le site de NCBI. Ensuite la lecture des échantillons va se faire en comparant la séquence obtenue de l'échantillon à la séquence de référence pour pouvoir détecter les mutations et les polymorphismes présents dans chaque échantillon (Figure 14).

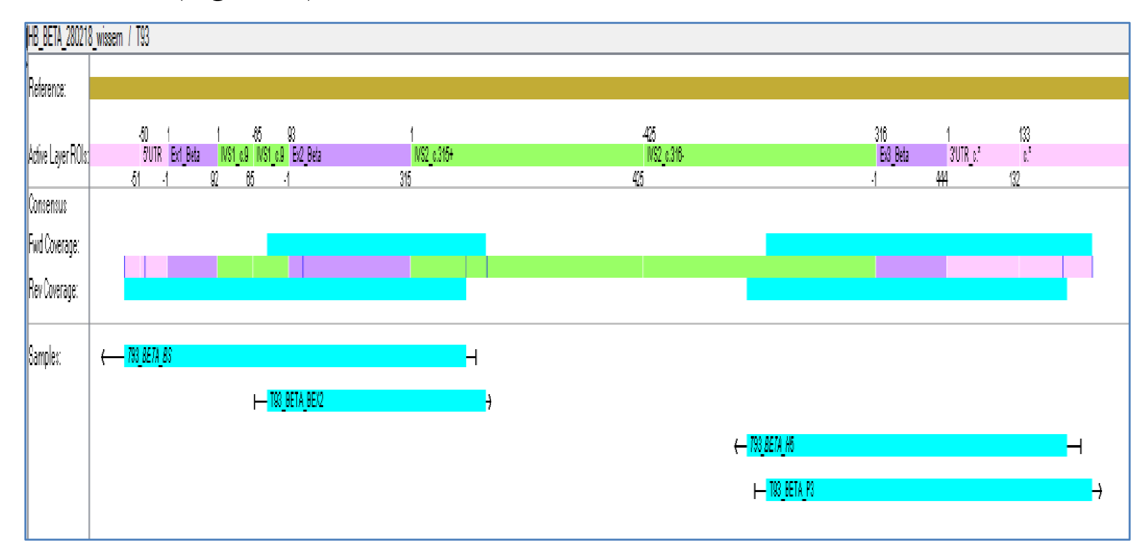


Figure 14: Présentation de l'amplification des amorces sur le logiciel SeqScape 3 et comparaison de cette amplification avec la séquence de la référence.

3.4. Recherche des délétions du gène alpha globine par une multiplex Gap-PCR

3.4.1. Principe de la multiplex GAP-PCR

La PCR multiplexe est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, par l'utilisation d'au moins trois amorces par réaction de PCR. Les produits de PCR ne seront alors compétitifs que pour la polymérase, les dNTP et, éventuellement, le marqueur d'ADN. Il est également possible d'amplifier différents types d'ADN reconnus par un même couple d'amorces, tels les mimics. La Gap-PCR détecte la suppression qui pourrait être manquée par l'ADN lors du séquençage. Des amorces spécifiques sont conçues pour flanquer une suppression connue. Le principe de la gap-PCR est basé sur l'incapacité des amorces à générer un produit PCR sauf si une suppression rejoint les séquences flanquantes ensemble. Si une suppression est présente, l'amplification PCR se produira et le produit est examiné par électrophorèse **(Lam et al. 2013).**

3.4.2. Mode opératoire

Pour ce travail de thèse, nous avons recherché pour l'ensemble des patients inclus dans l'étude les 5 délétions alpha-thalassémiques les plus fréquentes : - 3.7 Kb, - 4.2 Kb, SEA, MED et - 20.5 Kb. Pour cela, une technique de gap-PCR multiplex, déjà décrite auparavant (Chong et al., 2000), a été utilisée. Le principe de la gap-PCR repose sur l'éloignement trop important des amorces utilisées (Tableau 7) en l'absence de délétion empêchant alors l'amplification PCR. En cas de délétion, les amorces se reprochent et l'amplification peut se faire. Comme l'ensemble des délétions emportent le gène HBA2 (Figure 15), l'utilisation d'amorces amplifiant le gène HBA2 permet d'avoir un témoin négatif qui donne un produit PCR pour chaque allèle porteur d'aucune des 5 délétions citées plus haut.

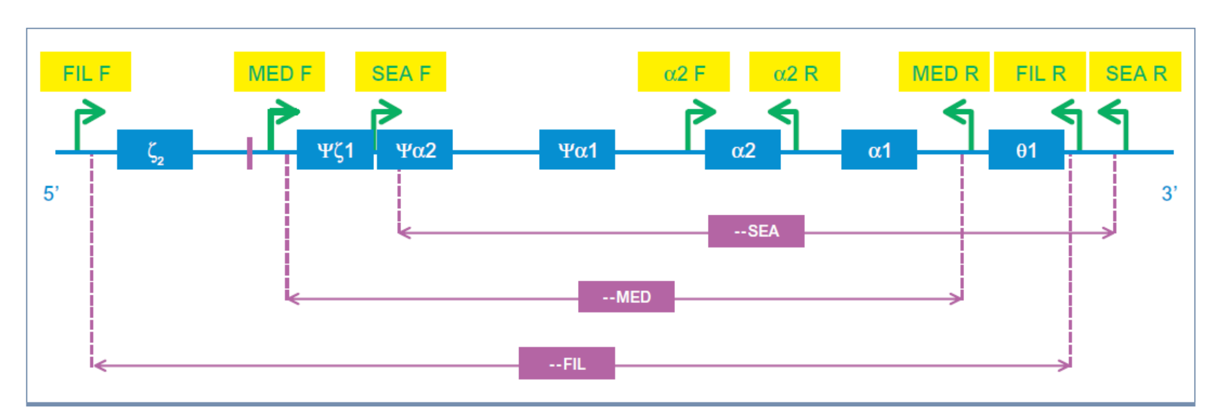


Figure 15: **Représentation schématique du cluster alpha-globine avec les principales délétions et couples d'amorces correspondants (**Mekouar et al. 2009**).**

Tableau 6: Les amorces utilisées dans multiplex alpha (Chong et al., 2000).

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique	Nucléotides
MED F	5'-TACCCTTTGCAAGCACACGTAC-3'	152259-152280
MED R	5'-TCAATCTCCGACAGCTCCGAC-3'	170339-170319
Alpha 2 R	5'-AGACCAGGAAGGGCCGGTG-3'	163684-163666
Alpha 2 /3.7 F	5'-CCCCTCGCCAAGTCCACCC-3'	161882-161900
20.5 F	5'-GCCCAACATCCGGAGTACATG-3'	147040-147060
3.7/20.5 R	5'-AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG-3'	167718-167698
4.2 F	5'-GGTTTACCCATGTGGTGCCTC-	159268-159287
4.2 R	5'-CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC-3'	165141-165120
SEA F	5'-CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC-3'	155256-155276
SEA R	5'-AGCCCACGTTGTGTTCATGGC-3'	175908-175888

Chaque réaction contient 50ng d'ADN, 0,01 nmol de chacune des amorces (Eurofins genomics), 25µL de GoTaq® G2 Colorless Master Mix (Promega, Madison) qui est un mélange prêt à l'emploi contenant le tampon, les désoxynucléotides, la polymérase et le chlorure de magnésium ($MgCl_2$) à des concentrations adéquates ainsi que 10µL de bétaïne qui a pour rôle de diminuer la température de dénaturation de l'ADN du gène Alpha (riche en liaison CG assez rigide). On complète ensuite avec de l'eau exempte de nucléase pour un volume réactionnel global de 50µL. On utilise un Mix témoin qui contient des ADN connus pour chaque type de délétion et qui sert à être un ladder pour la réaction de PCR.

L'amplification se fait ensuite dans un thermocycleur avec une dénaturation initiale de 5 min à 95°C puis 30 cycles de [Dénaturation - 97°C - 45s ; Hybridation – 61°C – 1min15 ; Elongation – 72°C – 2min30] et une élongation finale de 5 min à 72°C. Après amplification, 25µL de produit PCR sont déposés sur une plaque 96 puits et analysés par électrophorèse capillaire sur le LabChip Gx (Caliper Life Sciences, Massachusetts). La taille de l'amplicon étant différente pour chacune des délétions, il est facile de les mettre en évidence.

3.5. Génotypage du polymorphisme Xmn1 par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) sur Light-cycler LC480

Le transfert d'énergie par résonance en fluorescence appelé plus communément FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est un phénomène qui se produit entre un donneur fluorescent et un accepteur fluorescent. Dans des conditions idéales de FRET, l'excitation du donneur provoque un transfert d'énergie vers l'accepteur qui émet dans ses longueurs d'onde. Pour la recherche de polymorphisme, on va utiliser une sonde « donneur » porteuse en 3' du fluorophore émetteur appelé reporter et une sonde « accepteur » porteuse en 5' du fluorophore accepteur appelé quencher. La sonde « donneur » doit couvrir la position où se trouve le polymorphisme à génotyper, on la rend donc complémentaire soit de l'allèle sauvage, soit de l'allèle muté. Les sondes sont choisies de façon à s'hybrider à leurs séquences cibles en n'étant séparées que de 1 à 5 nucléotides. Lorsque les deux sondes sont séparées, le fluorophore émetteur n'émet qu'un bruit de fond de fluorescence alors que lorsqu'elles sont hybridées à moins de 10 nucléotides, la proximité des 2 fluorophores permet le transfert de l'énergie du reporter vers le quencher provoquant l'émission fluorescente de ce dernier (Figure 16).

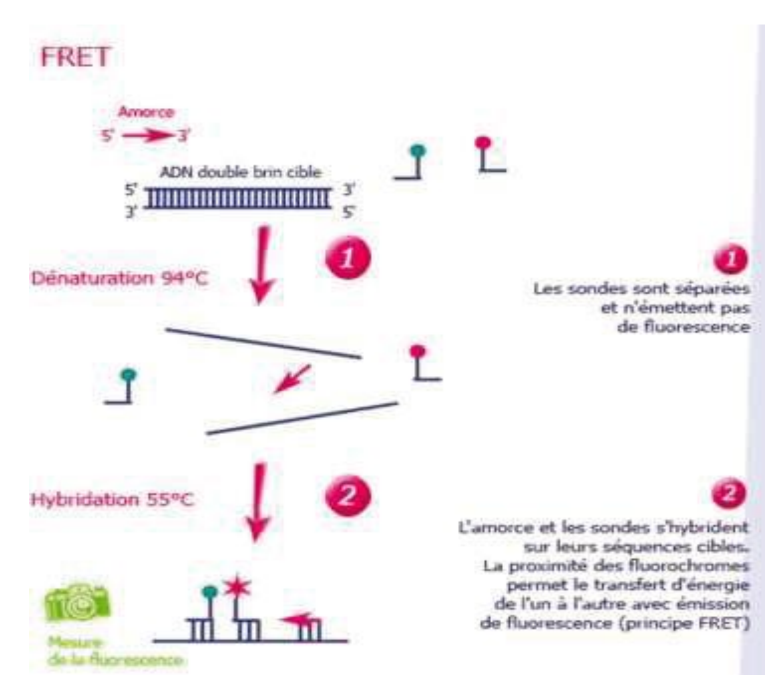


Figure 15: Principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Après une réaction PCR classique, on réalise une dénaturation du produit d'amplification (1). Un couple de sondes est rajouté dans le milieu réactionnel et choisi de façon à s'hybrider à leurs séquences cibles en n'étant séparées que de 1 à 5 nucléotides. La proximité des fluorochromes permet le transfert d'énergie et l'émission de fluorescence (2).

Protocole opératoire

Cette technique FRET a été utilisée pour la recherche des polymorphismes pour HincIIH, XmnI et HincIIG ainsi que pour la recherche rapide des mutations ES et EC. Dans notre étude, la technique FRET a été utilisé pour la recherche du polymorphisme Xmn1.

Dans un premier temps, une réaction PCR classique est réalisée dans un volume de 30µL avec 50ng d'ADN pour XmnI, 100ng d'amorces et 10µL de GoTaq Colorless mix 2X (Promega, Madison) qui est un mélange prêt à l'emploi contenant le tampon, les désoxynucléotides, la polymérase et le chlorure de magnésium ($MgCl_2$) a des concentrations adéquates. L'amplification se réalise dans un thermocycleur selon les conditions suivantes : dénaturation initiale de 5 min à 95°C puis 35 cycles de [Dénaturation - 95°C - 30s ; Hybridation – 58°C – 30s ; Elongation – 72°C – 1min] et une élongation finale de 5 min à 72°C.

Dans un deuxième temps, 2,5 µL de sondes (1,25mM) sont ajoutés. Le mélange est ensuite transféré dans le LightCycler®480 (Roche, Meylan, France). Le produit d'amplification PCR est dénaturé 10 min à 99°C. S'en suit ensuite une étape de 10s à 50°C permettant l'hybridation des sondes puis l'augmentation progressive de température de 50 à 75°C (transition 0,1°C/s) va provoquer la dénaturation progressive des sondes et la température de fusion va ainsi dépendre du génotype du patient. On va ainsi étudier la dérivée première de la courbe de variation de fluorecence en fonction du temps. Les couples d'amorces et de sondes utilisés pour l'étude du polymorphisme XmnI est répertoriées dans le tableau 8.

Tableau 7: Les amorces et les sondes utilisés pour la recherche du polymorphisme Xmn1 par FRET (Joly et al., 2011).

Amorces	Sondes
Forward 5'-CTGAAACTGTTGCTTTA-3'	LC_FITC 5'-CTGAAACGTCCCTGGCTAAAC-3'
Reverse 5'-GCCTCACTGGATACTCTAAGA-3'	LC_Red640 5'-CACCCATGGGTTGGCCAGCTTGC-3'

3.6. Génotypage des QTLs de L'HbF par HRM (High Melting Resolution) sur Light-cycler LC480

3.6.1. Principe de la méthode

L'analyse des courbes de fusion à haute résolution, ou High Resolution Melt (HRM) est une technique de biologie moléculaire permettant la détection de mutations, de polymorphismes et de différences épigénétiques dans des échantillons d'ADN.

La région de l'ADN potentiellement porteuse de la mutation est d'abord amplifiée par PCR. Puis l'amplicon est chauffé très progressivement et précisément d'environ 50°C à 95°C. À un certain point, les deux brins d'ADN se séparent : c'est ce processus que l'on appelle fusion de l'ADN. Le principe de l' HRM est d'observer cette fusion en temps réel. Cela est possible grâce à des composés particuliers, appelés fluorochromes intercalants, qui ont la propriété de devenir plus fluorescents lorsqu'ils sont fixés à de l'ADN double brin. En l'absence de double brin, ils ne peuvent pas se fixer donc leur niveau de fluorescence baisse. Au début de l'analyse HRM (Figure 16), à la plus basse température, l'intensité de fluorescence est très importante, car l'ensemble de l'amplicon est présent sous forme double brin. Mais, au fur et à mesure que la température augmente et que les brins se séparent, la fluorescence diminue. L'enregistrement de l'intensité de fluorescence en fonction de la température est appelée courbe de fusion.

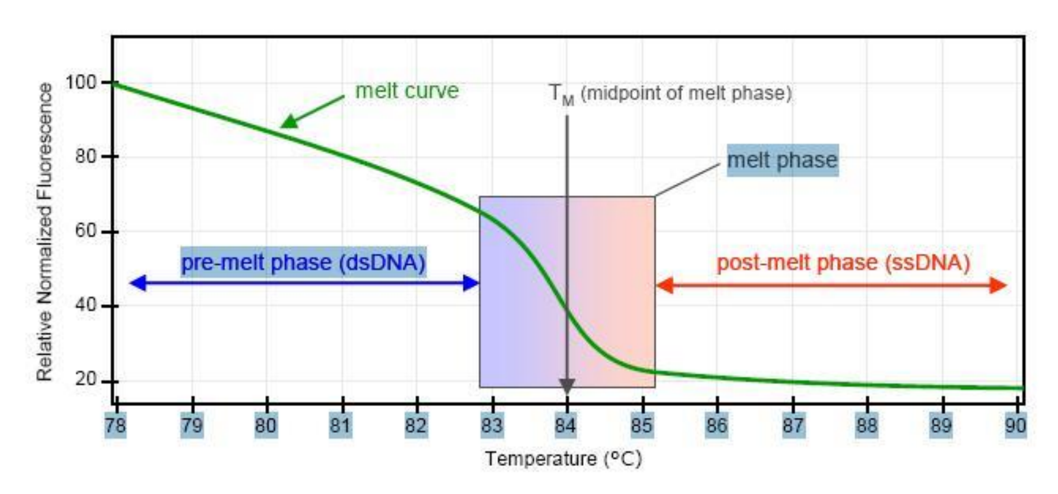


Figure 16: Graphe HRM de base (Renoux C, 2012)

La courbe de fusion (verte) représente la transition de l'amplicon étudié de l'état double brin (émission maximale de fluorescence) à l'état simple brin (émission basale de fluorescence de l'intercalant). On appelle 'phase de fusion' ou 'melt phase' l'intervalle de températures pour

lequel la dissociation double brin > simple brin est la plus importante. Le Tm est la température correspondant au milieu de cette phase de fusion.

Si cette séquence comporte des variants, des mutants, ou des délétions, tout changement, même mineur, dans la séquence de l'ADN conduit à une variation de la cinétique de fusion, qui peut être détectée grâce à la haute résolution utilisée, comme le montre cet exemple :

Comme un sujet possède deux copies de chaque gène, il y a trois possibilités :

1. Aucun allèle ne contient la mutation (Type sauvage ou normal)

2. L'un ou l'autre des deux allèles contient la mutation (Hétérozygote)

3. Les deux allèles contiennent la mutation (Homozygote)

Les deux allèles étant amplifiés simultanément, la courbe de fluorescence que l'on observe correspond à la somme des courbes de fluorescences des deux allèles. Comme le Tm de dissociation est différent pour chaque duplex, il en résultera des profils HRM distincts pour les 3 génotypes possibles que l'on pourra interpréter en les associant à des témoins normaux, hétérozygotes et homozygotes :

3.6.2. Protocole opératoire

Chaque réaction PCR contient 2 µL qui est égale à presque100ng d'ADN, 100ng de chaque amorce, 10µL de Master mix Coloreless GoTaq, 2,5mM de MgCl2 et le mélange réactionnel est complété à 20µL par de l'eau exempte de nucléase. Le LightCycler® 480 High Resolution Melting Master mix est un mélange prêt à l'emploi contenant les réactifs nécessaires à la PCR ainsi qu'un agent fluorescent (agent intercalant de seconde génération qui ne subit pas de recapture) se fixant sur l'ADN double-brin. L'amplification se réalise sur le LightCycler®480 (Roche, Meylan, France) selon les conditions suivantes : dénaturation initiale de 10 min à 95°C puis 35 cycles de [Dénaturation - 95°C - 30s ; Hybridation – 58°C – 30s ; Elongation – 72°C – 1min] et une élongation finale de 5 min à 72°C. Après l'amplification, 15 µL du produit PCR est réparti dans une plaque **blanche de 96 puits** ' lightCycler 480 multiwell plate 96 (Roche Diagnosticà, et le peigne bleu utilisé pour faire adhérer le film à la plaque et on ajoute 1 µL de l'agent fluorescent Syto9 dilué au 1/100 de la solution mère.

L'analyse des courbes de fusion à haute résolution est aussi réalisée sur LightCycler®480 (Roche, Meylan, France). On débute par une dénaturation initiale de 94°C pendant 10 min puis une hybridation à 40min pendant laquelle l'agent fluorescent se fixe. Lors de cette étape d'hybridation, il y aura formation soit uniquement d'homoduplex (amplicons de PCR double brin où chaque brin est identique) dans les cas des variants homozygotes ou des patients homozygotes sauvages, soit à la fois d'homoduplex et d'hétéroduplex (amplicons de PCR formés d'un brin d'ADN muté et d'un brin d'ADN sauvage) dans les cas des variants à l'état hétérozygote (Figure 17). Enfin on augmente progressivement la température de 70°C à 97°C avec des transitions de 0,1°C/s et on réalise une acquisition continue de la fluorescence. Pendant cette étape, l'ADN va se dénaturer (fusion) et la fluorescence va diminuer de façon proportionnelle. Cette dénaturation sera plus ou moins rapide selon la séquence nucléotidique du fragment d'intérêt. Dans le cas des hétérozygoties, la courbe de fusion sera la somme algébrique des courbes de fusions correspondant aux différents duplex formés.

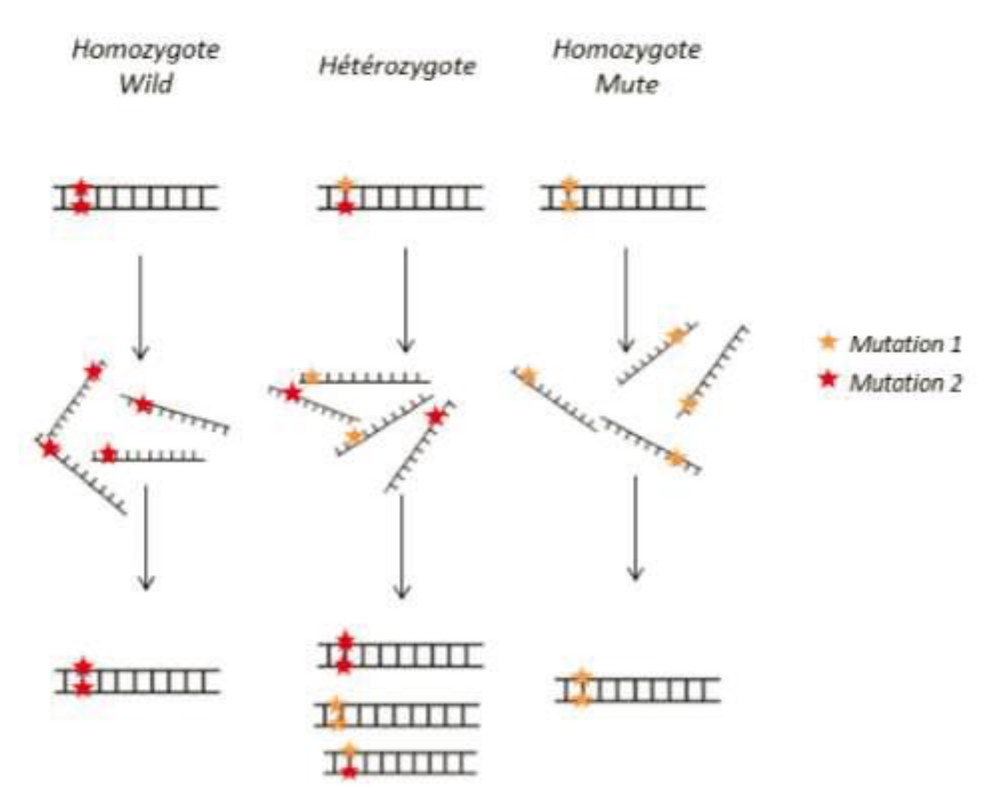


Figure 17 : Représentation schématique de l'HRM Après amplification par PCR, du fragment d'intérêt **(Renoux C, 2012).**

Une étape de dénaturation est effectuée puis la baisse de la température permet la réassociation des brins de f açon aléatoire. Ainsi dans le cas des homozygotes, il y aura uniquement formation d'homoduplex mais dans le cas des hétérozygotes il y aura à la fois formation d'homoduplex et d'hétéroduplex.

3.7. Confirmation des cas douteux d'HRM par le kit ß-Thal Modifier StripAssay

Pour la confirmation des cas douteux issus de l'HRM, le kit ß-Thal Modifier StripAssay (ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienne, Autriche) a été utilisé pour confirmer les patients qu'on n'a pas pu déduire leur état pour les polymorphismes des gènes modificateurs. Il s'agit un kit très facile à utiliser qui est basé sur hybridation inverse de la PCR qui utilise des amorces biotinylés.

Elle se fait en trois étapes :

1. Une amplification par multiplex PCR sur thermocycler
2. Hybridation dans un incubateur directemet sur les bandelettes de test de StripAssay
3. Identification très facile des bandes à l'œil nu à cause de la présence du complexe streptavidine-phosphatase Alcaline qui va faire la réaction de coloration.

3.8. Calcul du score Thalassemia Severity Score (TSS)

Le score TSS (Thalassemia Severity Score) a été conçu par Danjou, et al. en 2015 pour décrire à partir du profil génétique du patient le dégrée de gravité clinique de la maladie après des décennies de recherche sur les bases génétique de la beta thalassémie. Cette étude multicentrique a utilisé l'âge à la première transfusion observé chez plus de 800 patients bêta-thalassémiques comme substitut de la gravité clinique pour produire le score de gravité de la thalassémie. Le score varie de 0 à 10 dans l'ordre croissant de la gravité clinique.

Le score est calculé pour chaque patient à partir des résultats du génotypage des chaines β et α globine et des QTLs de l'hémoglobine F. La classification des mutations β° et β+ thalassemiques est fourni par les informations supplémentaires de Danjou, et al. Une application en ligne est disponible selon l'url : *http://tss.unica.it*.

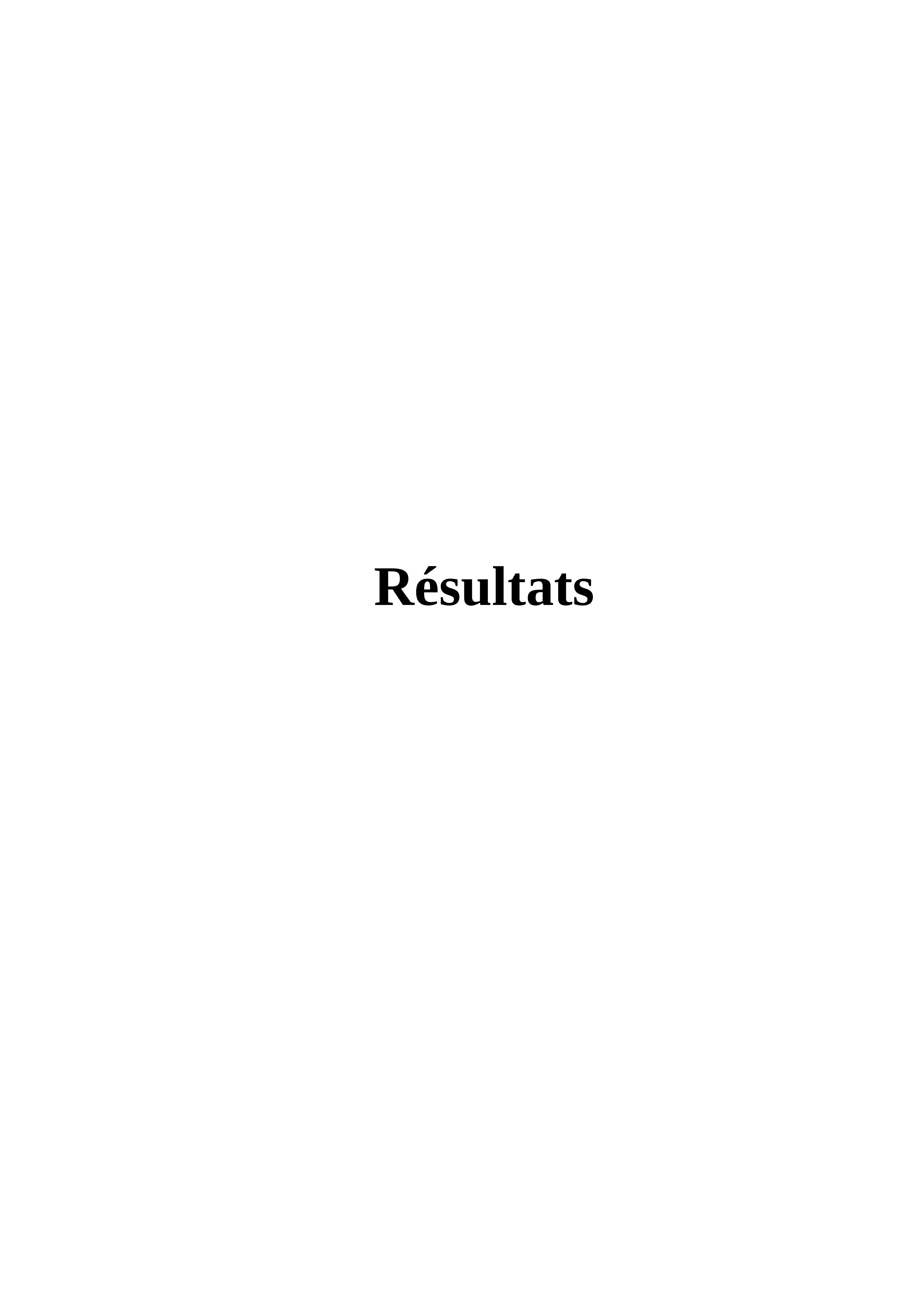
Par la suite, chaque patient est classé en fonction de la valeur de TSS calculé dans l'une des catégories suivantes : Gravité faible ($TSS \leq 3$), gravité légère ($3 < TSS \leq 5$), gravité élevée ($5 < TSS \leq 7$) et gravité très élevée ($TSS > 7$).

3.9. Analyse et traitement statistique des données

L'analyse statistique a été réalisé en utilisant le logiciel SPSS version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La signification statistique a été défini à $p <0,05$. Les variables continues ont été rapportées comme moyenne ± écart type (SD) alors que les variables qualitatives sous forme de nombre (N) ou de fréquence.

Le test du Chi-carré a été utilisé pour comparer les fréquences alléliques des mutations et des différents polymorphismes entre les trois provinces du nord-est d'Algérie. Il a également été utilisé pour comparer la fréquence des événements cliniques qualitatifs entre les trois provinces et entre les quatre catégories de TSS. Une analyse à sens unique de

variance (ANOVA) a été utilisée pour comparer les valeurs moyennes des valeurs quantitatives paramètres biologiques et cliniques entre les trois provinces et entre les quatre groupes de TSS.



Résultats

Axe I : Caractérisation moléculaire des patients beta-thalassémiques

1. Résultats

1.1. Caractéristiques épidémiologiques de la population d'étude

1.1.1. L'âge des patients

L'âge des patients pendant la période de notre étude est illustrée dans la Figure 19. Vu que les patients inclus dans l'étude sont principalement des adultes, la majorité des patients (51,66%) appartiennent à la catégorie d'âge entre 21 et 30 ans avec une moyenne d'âge de 22.8 ± 4.8 ans.

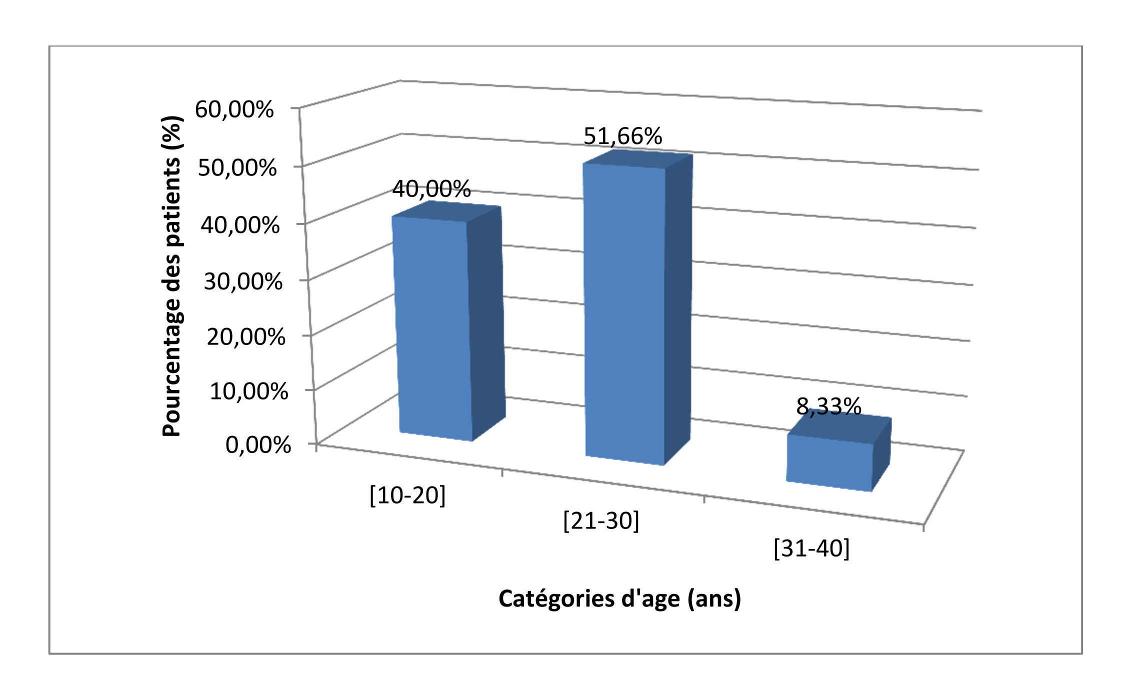


Figure 19: Répartition des patients de la population d'étude selon l'âge actuel

L'âge des patients au moment du diagnostic de la maladie est représenté dans la Figure 20. Les hémoglobinopathies représentent des maladies à révélation pédiatrique c'est-à-dire en période infantile. C'est pourquoi la majorité des patients, à savoir 35 cas sur 60, soit 58,3%, l'âge du diagnostic est situé entre 0 et 1 an avec une moyenne d'âge de diagnostic de 17 ± 23 mois.

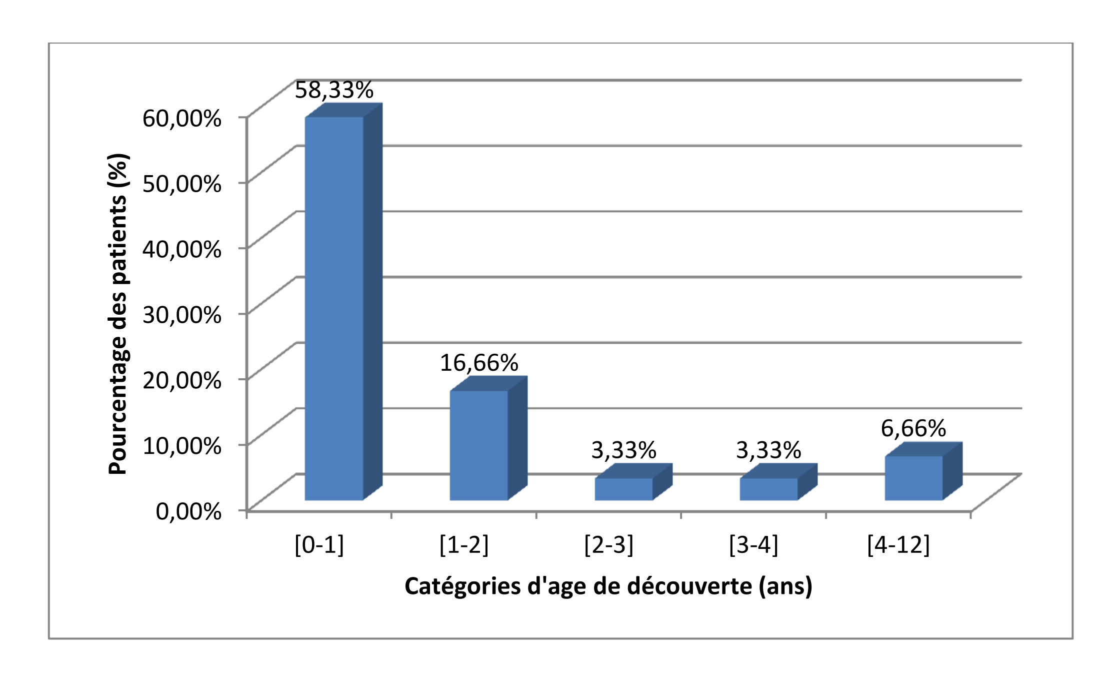


Figure 20: Répartition des patients de la population d'étude selon l'âge de découverte de la maladie

L'âge de la première transfusion pour tous les patients est représenté dans la Figure 21. Les résultats montrent que la catégorie d'âge de la première transfusion la plus majoritaire (24 patients sur 60) est située dans le groupe d'âge entre 0 et 12 mois.

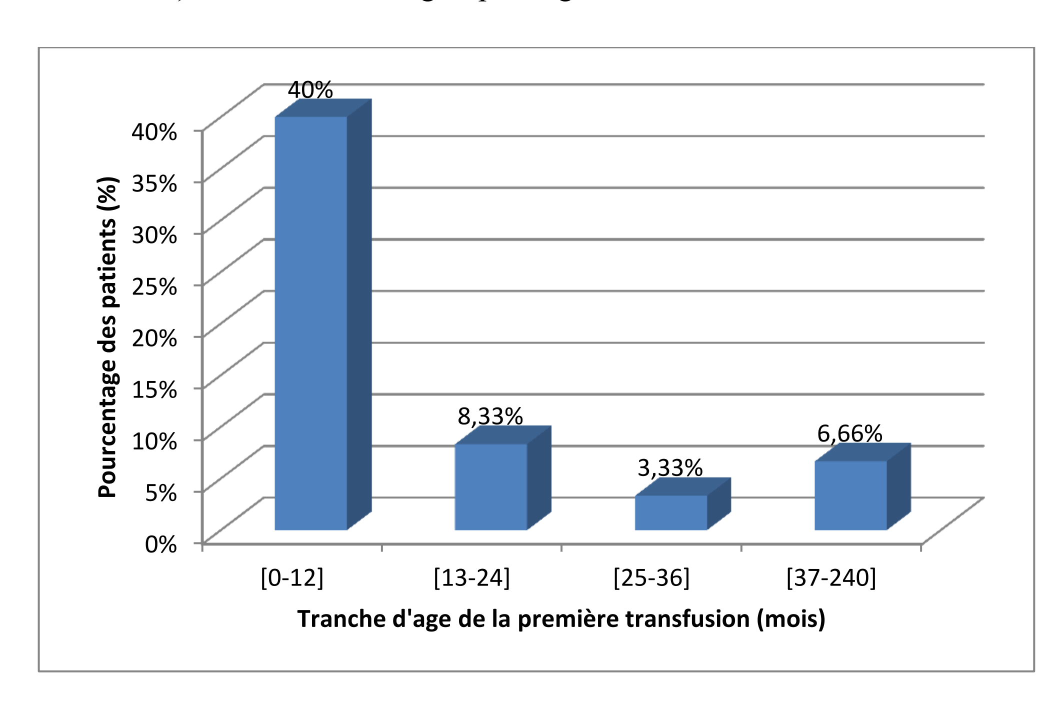


Figure 21: Répartition des patients de la population d'étude selon l'âge de la première transfusion en mois

1.1.2. Sexe des patients

La répartition des patients β-thalassémiques selon le sexe est illustrée dans la Figure 22. Nous soulignons une légère prédominance féminine avec un sexe ratio (M/F) de 27/33.

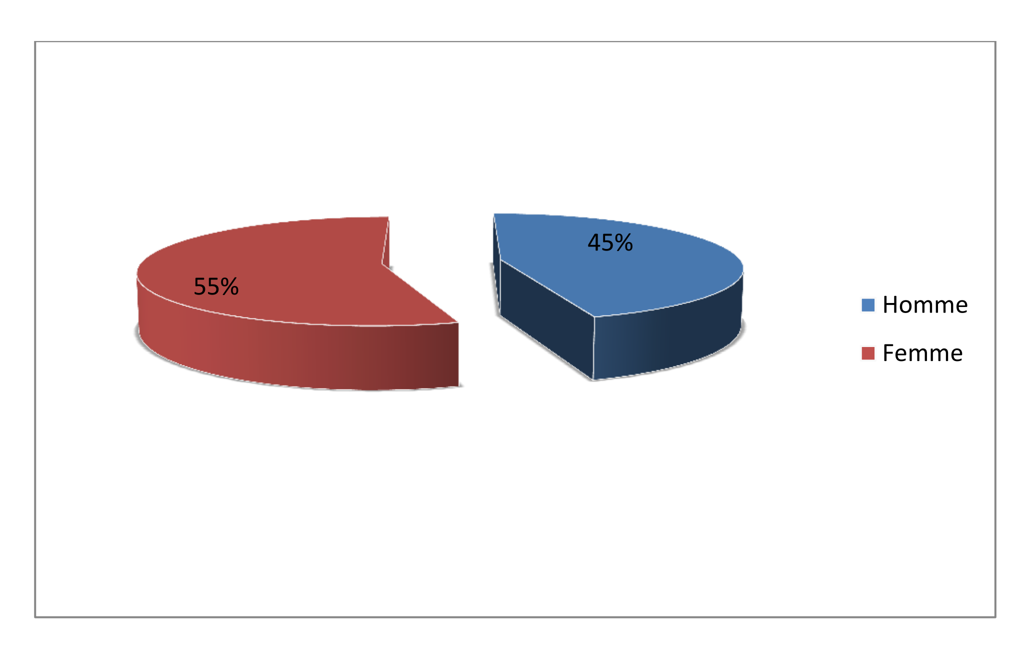


Figure 22: Répartition des patients de la population d'étude selon le sexe

1.1.3. Origine géographique des patients

La Figure 23représente la répartition des patients selon leur origine géographique. Vu que l'étude a été faite au niveau du service d'hématologie CHU Dorban Annaba, on note une prédominance des patients originaires de la région d'Annaba.

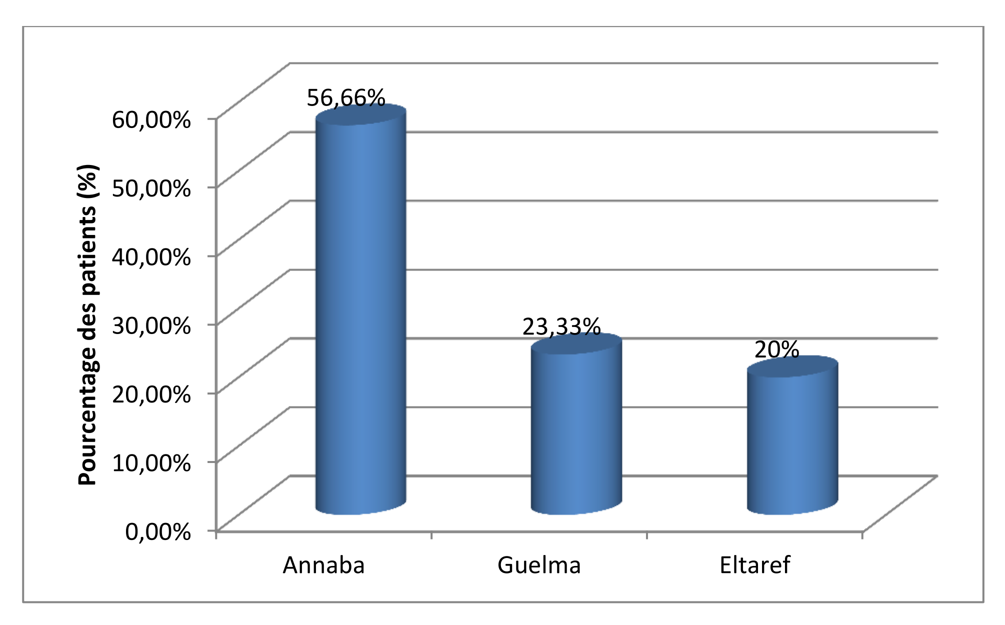


Figure 16: Répartition des patients de la population d'étude selon leur origine géographique.

1.1.4. Consanguinité et cas similaires dans la fratrie

La β-thalassémie est une maladie héréditaire autosomique à transmission récessive. La consanguinité représente un facteur de risque principal de la propagation de la maladie surtout en milieu rural. Le nombre de patients issus d'un mariage consanguin et non consanguin est illustré dans la Figure 24. Les patients issus d'un mariage consanguin représentent 46,66% du total des patients β-thalassémiques, alors que les patients issus de mariage non consanguin représentent 53,34%.

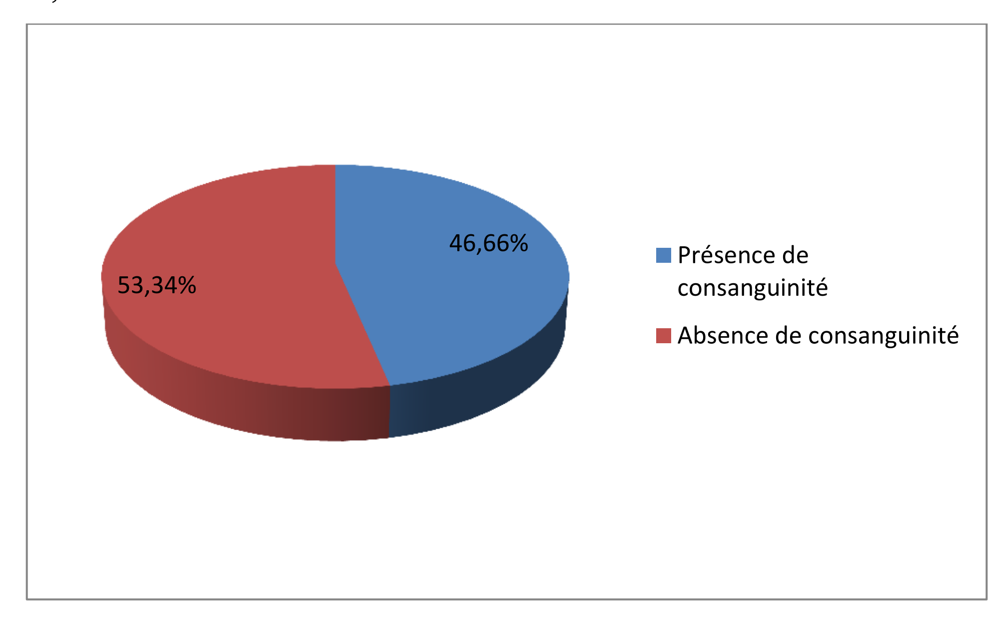


Figure 17: Répartition des patients de la population d'étude selon la consanguinité

La Figure 25 représente la répartition des patients selon la présence des cas similaires dans la fratrie. On note une légère prédominance des patients qui ont des antécédents familiaux de la même maladie par rapport à ceux qui n'y ont pas.

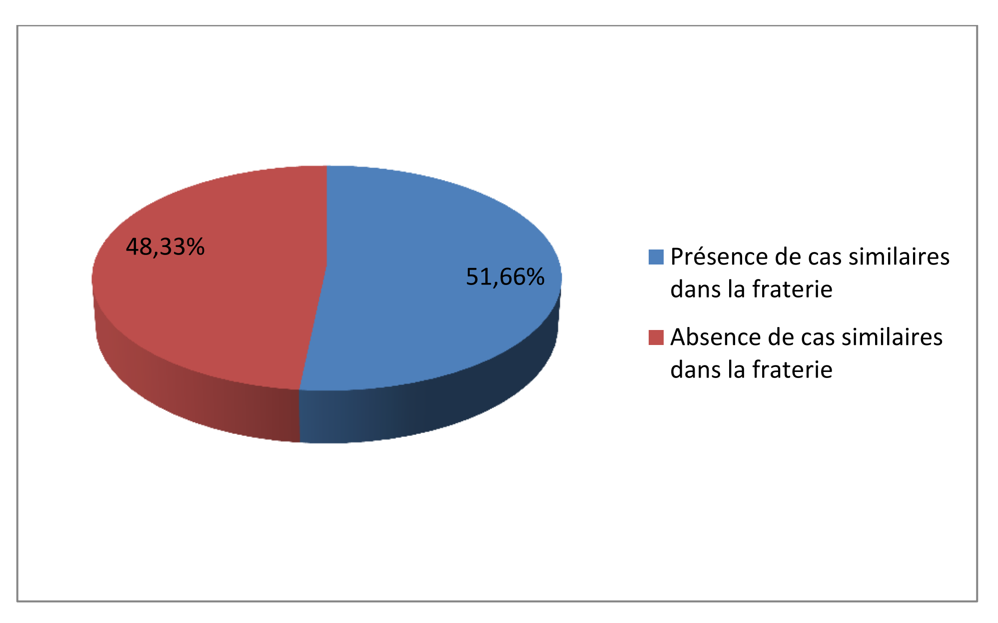


Figure 18: Répartition des patients de la population d'étude selon la présence des cas similaires dans la fratrie

1.2. Caractéristiques cliniques de la population d'étude

1.2.1. Répartition des patients selon la réalisation d'une splénectomie

La splénectomie est l'ablation totale de la rate chez les patients présentant une anémie héréditaire vu que c'est le siège de la destruction des GR et on note la présence d'une splénomégalie assez importante chez les patients atteints. La Figure 26 représente la répartition des patients selon la réalisation d'une splénectomie au cours de la vie des patients ou non. On observe une grande prédominance des patients splénectomisés par rapport aux autres avec un pourcentage de 73.3% de splénectomie.

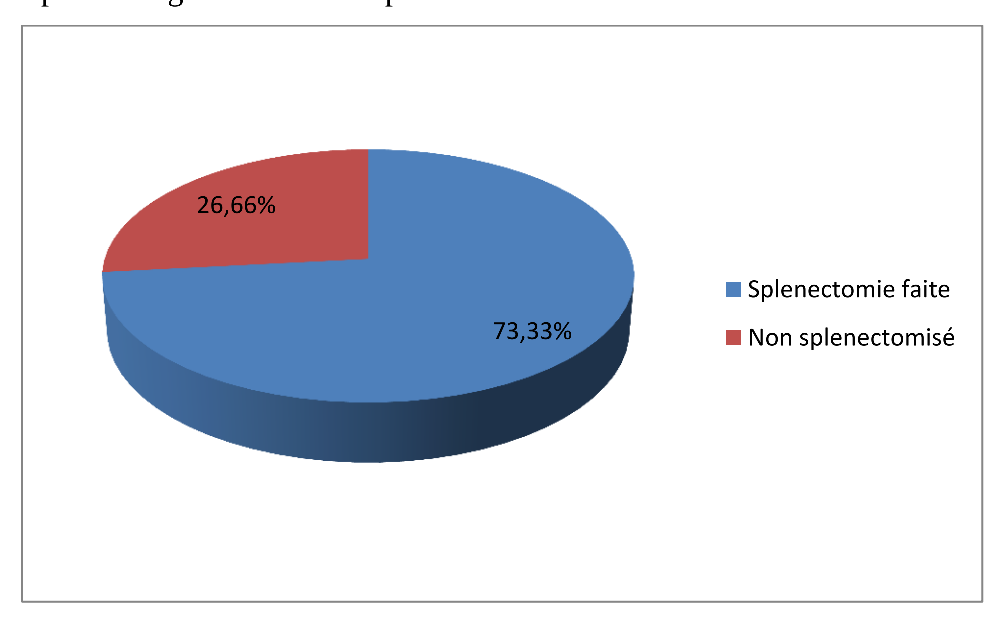


Figure 19: Répartition des patients de la population d'étude selon la splénectomie.

La Figure 27 représente la répartition des patients selon l'âge de la réalisation de la splénectomie au cours de la vie des patients. On note une grande prédominance de la catégorie d'âge des patients entre 7 et 12 ans avec une moyenne d'âge de 9.6 ± 3.7 ans.

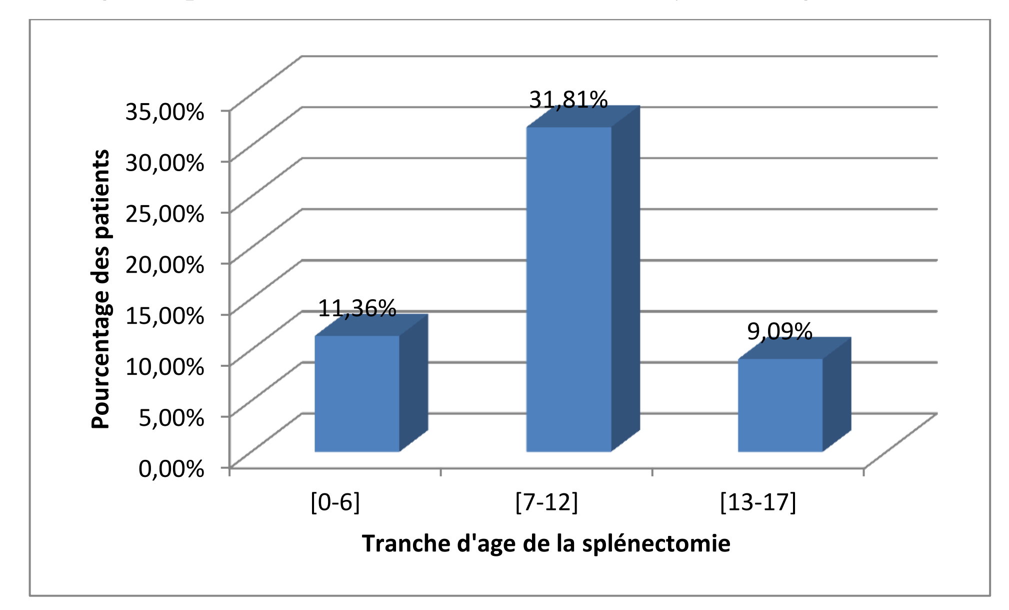


Figure 27: Répartition des patients de la population d'étude selon l'âge de la splénectomie des patients

1.2.2. Répartition des patients selon l'intervalle entre deux transfusions

Les patients atteints de la β-thalassémie présentent une anémie sévère qui nécessite des transfusions régulières pour améliorer les symptômes. L'intervalle entre deux transfusions réalisées est très variable et dépend du taux de l'hémoglobine (Hb) de chaque patient. La Figure 28 représente la répartition des patients de la population d'étude selon l'intervalle entre deux transfusions. La majorité des patients appartient à une catégorie d'un régime normal de 3 semaines d'intervalle entre deux transfusions avec une moyenne de 3.2 ± 0.9 semaines.

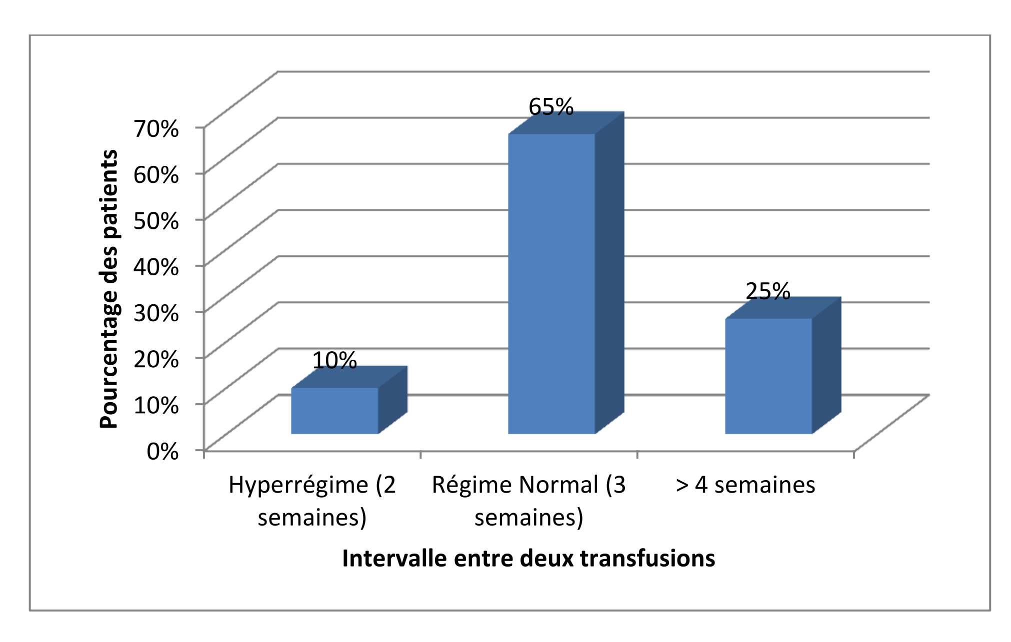


Figure 28: Répartition des patients de la population d'étude selon l'intervalle entre les transfusions

1.2.3. Prévalence des cas de sérologie HCV positif dans la population d'étude

Le principal risque observé lors des transfusions sanguines répétées est la transmission de certaines maladies virales à cause de l'utilisation de produits sanguins contaminés. La Figure 29 représente le nombre de cas de sérologie HCV positif dans la population d'étude. On note la présence de 6 cas de sérologie HCV positive sur une population de 60 patients ce qui représente un pourcentage de 10% des patients.

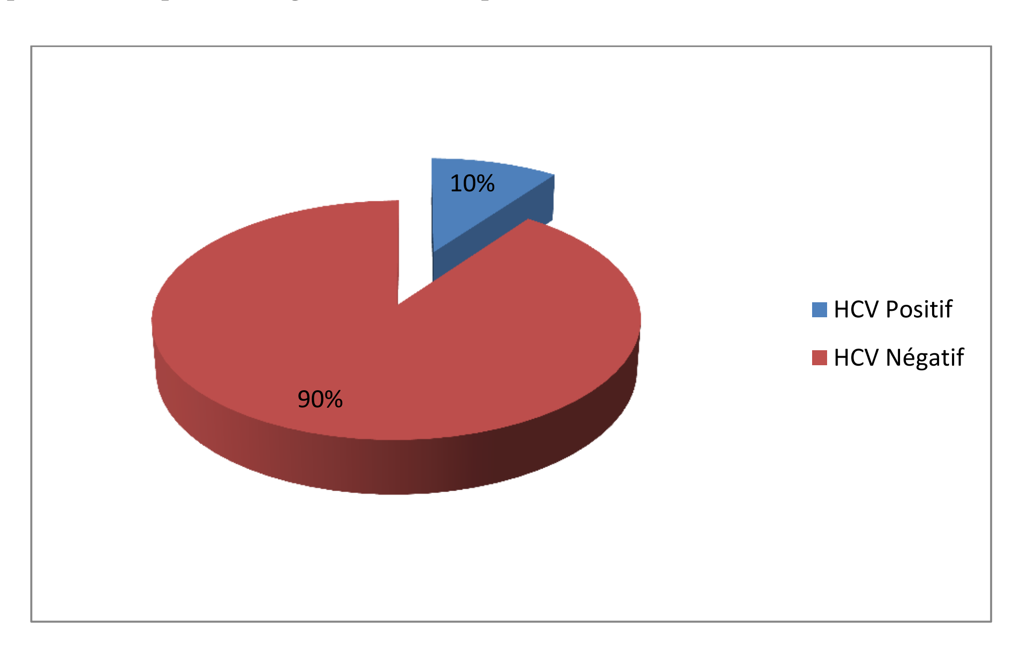


Figure 209: Répartition des patients de la population d'étude selon le statut de la sérologie HCV

1.2.4. Répartition de la population selon le phénotype du patient (homozygote/ hétérozygote)

La β-thalassémie est une maladie héréditaire qui se présente selon plusieurs phénotypes en fonction nombre d'allèles atteint de la maladie issus de deux parents père et mère. La répartition de la population d'étude selon le phénotype du patient (homozygote/ hétérozygote) est illustrée dans la Figure 30. Une prédominance des homozygotes est remarquée par rapport aux hétérozygotes avec un pourcentage de 58.33% pour les homozygotes et de 41.67% pour les hétérozygotes.

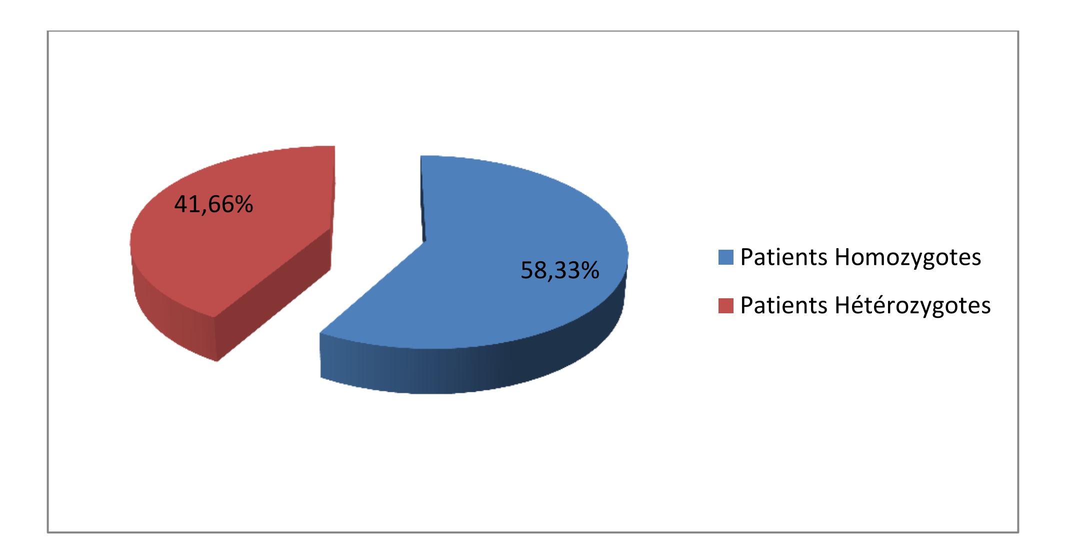


Figure 30: Répartition des patients de la population d'étude selon le phénotype du patient

1.2.5. Répartition des patients selon la classe du score TSS (Thalassemia Severity Score)

Le thalassemia severity score (TSS) est une score génétique compilant dans un algorithme le sexe, le génotype β, le génotype α (nombre de gènes alpha fonctionnels) et les résultats de génotypage des SNPs *XmnI*, rs1447407 et rs10189857 sur *BCL11A* et rs9399137 sur *HBS1L-MYB.* La Figure 31 montre la répartition des patients en fonction de la classe du TSS dans lesquelles ils appartiennent. Une prédominance est observée pour la classe « Very High » qui représente une classe où la valeur du TSS est supérieure à 7.

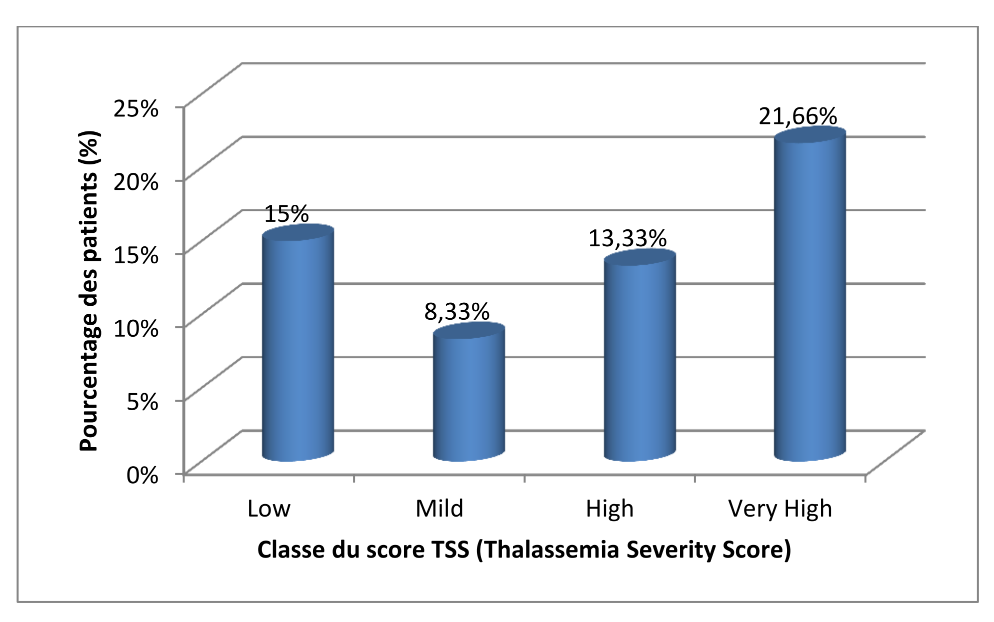


Figure 21: Répartition des patients de la population d'étude selon les classes du score TSS

1.3. Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques de la population β-thalassémique

Les principales caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques de la population β-thalassémique sont résumées dans le Tableau 8. L'âge moyen de la population d'étude est 22.8 ± 4.8 ans alors que le sexe ratio est 27H/33F. La présence du mariage consanguin est de l'ordre de 28 sur 60 patients c'est à dire un pourcentage de 46.66%.

Vu que la maladie est à révélation pédiatrique, l'âge moyen de découverte de la maladie est 17 ± 23 mois. 42 patients ont été splénectomisé avec un âge moyen de la réalisation de la splénectomie est 9.6 ± 3.7 ans. L'intervalle moyen entre deux transfusions chez les patients est de 3.2 ± 0.9 semaines avec un âge moyen de début de transfusion est de l'ordre de 22 ± 35 mois. 10 % des patients avaient une sérologie positive pour le virus de l'hépatite C (HCV).

Lors de la première visite de diagnostic, les paramètres de la FNS (Numération de la formule sanguine) dont l'Hb, l'hématocrite et VGM sont très diminués par rapport aux valeurs normales. Le taux moyen des GB et des plaquettes est dans les normes internationales. Dans l'électrophorèse de l'Hb réalisé pour les patients, le taux moyen de l'HbF des patients β-thalassémiques est 82.0 ± 24.0%. Il est assez élevé par aux valeurs normales de l'HbF (< 1%).

Les paramètres biochimiques observés sont recensés lors de la dernière visite médicale de surveillance des patients. La ferritinémie moyenne est de l'ordre 3836.0 ± 2497.0 µg/L qui est extrêmement élevée par rapport aux valeurs normales de la férritine. Le taux moyen de la bilirubine totale est également supérieur aux valeurs normales. Les taux des transmainases ASAT et ALAT sont élevés et aussi l'enzyme hépatique phosphatase alcaline (PAL) est très augmentée. La valeur de l'acide urique est dans les normes internationales.

Tableau 8: Les caractéristiques épidémio-clinico-biologiques de la population β-thalassémiques de la population d'étude

	Population de β-TM et β-TI (N=60)
Paramètres épidémiologiques	
Age (ans)	22.8 ± 4.8
Sexe	27 H/33 F
Consanguinité	28

Paramètres Cliniques	
Age de découverte (mois)	17 ± 23
Splénectomie	42
Age de splénectomie (ans)	9.6 ± 3.7
Intervalle entre les transfusions (semaines)	3.2 ± 0.9
Age de 1ére transfusion (mois)	22 ± 35
Sérologie HCV	6
Paramètres Biologiques	
1ére visite de diagnostic	
Hb (g/dL)	6.1 ± 1.9
HCT (L/L)	0.19 ± 0.05
GB (10^9/L)	17.3 ± 17.8
PLTs (10^9/L)	439.0 ± 291.0
HbF (%)	82.0 ± 24.0
Dernière visite avant transfusion	
Ferritine (µg/L)	3836.0 ± 2497.0
Bilirubine Totale (µmol/L)	39.0 ± 26.0
ASAT (UI/L)	46.0 ± 25.0
ALAT (UI/L	49.0 ± 31.0
PAL (UI/L)	316.0 ± 231.0
Acide Urique (µmol/L)	281.0 ± 120.0

Les valeurs en exprimés soit en nombre de cas (N) soit en moyenne ± écart-type. TM :Thalassémie Majeure ; TI : Thalassémie Intermédiaire ; Hb: Hemoglobine; HCT: Hématocrite; GB: Nombre de Globules blancs; ASAT: aspartate aminotransférase; ALAT: alanine aminotransférase; ALP: alcaline phosphatase; HCV: virus de l'hépatite C.

1.4. Les caractéristiques génotypiques de la population d'étude

1.4.1. Résultats du Séquençage Sanger des patients β-thalassémiques

Le séquençage direct de Sanger des patients béta thalassémiques a donné plusieurs types des mutations β° ou β^+ thalassémiques. Les figures 35, 36, 37, 38, 39 et 40 illustrent les principales mutations retrouvées à partir des résultats du séquençage Sanger lu sur le Logiciel SeqScape 3.0 (Applied Systems, CA, USA). La lecture se fait par rapport à une séquence de référence du gène HUMHBB est importée à partir du GenBank sur le site de NCBI.

La Figure 32 présente la mutation Codon 39 chez un patient homozygote. La figure illustre le remplacement de la base C par la base T dans la position 118 de l'exon 2 du gène beta de l'hémoglobine. Cette mutation engendre un remplacement de l'acide aminé glutamine en codon STOP pour la transcription de l'ARNm.

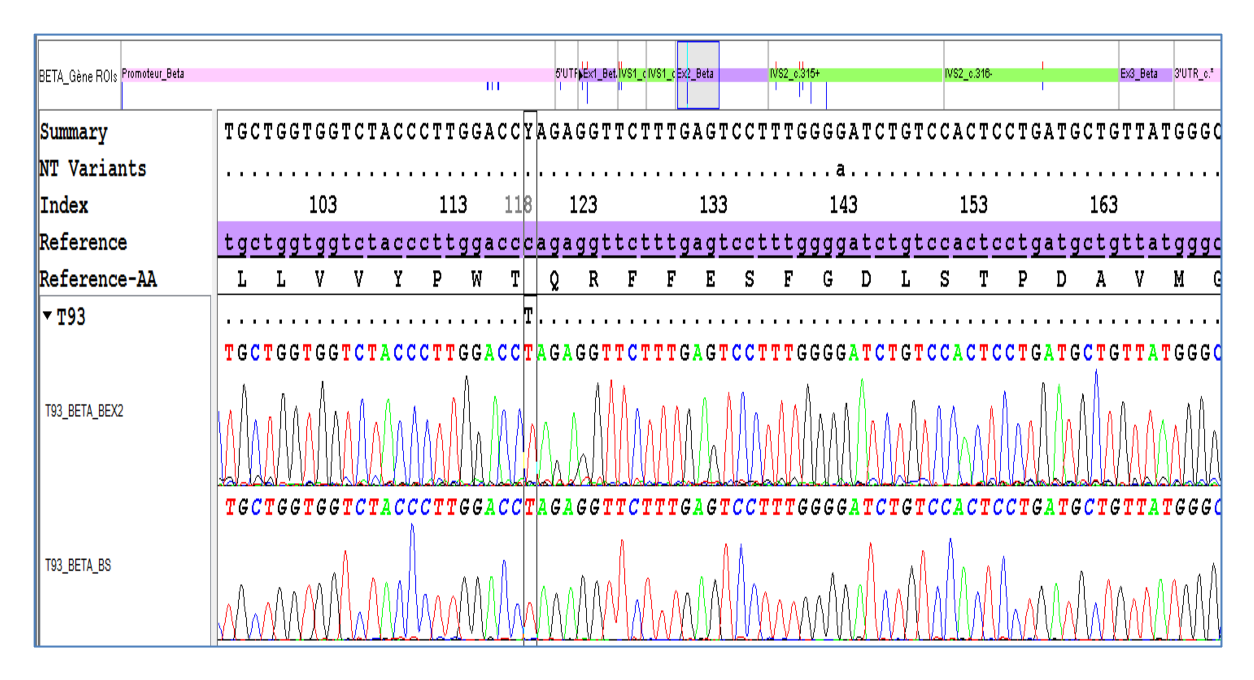


Figure 22: Codon 39 (C->T); CAG(Gln)->TAG(stop codon) β°: HBB:c.118C>T chez un patient homozygote.

La Figure 33 présente la mutation IVS-I-110 chez un patient hétérozygote. On observe le remplacement de la base G par la base A dans un seul allèle dans la position du nucléotide 93-21 dans la région intronique entre l'exon 1 et 2 du gène beta de l'Hb.

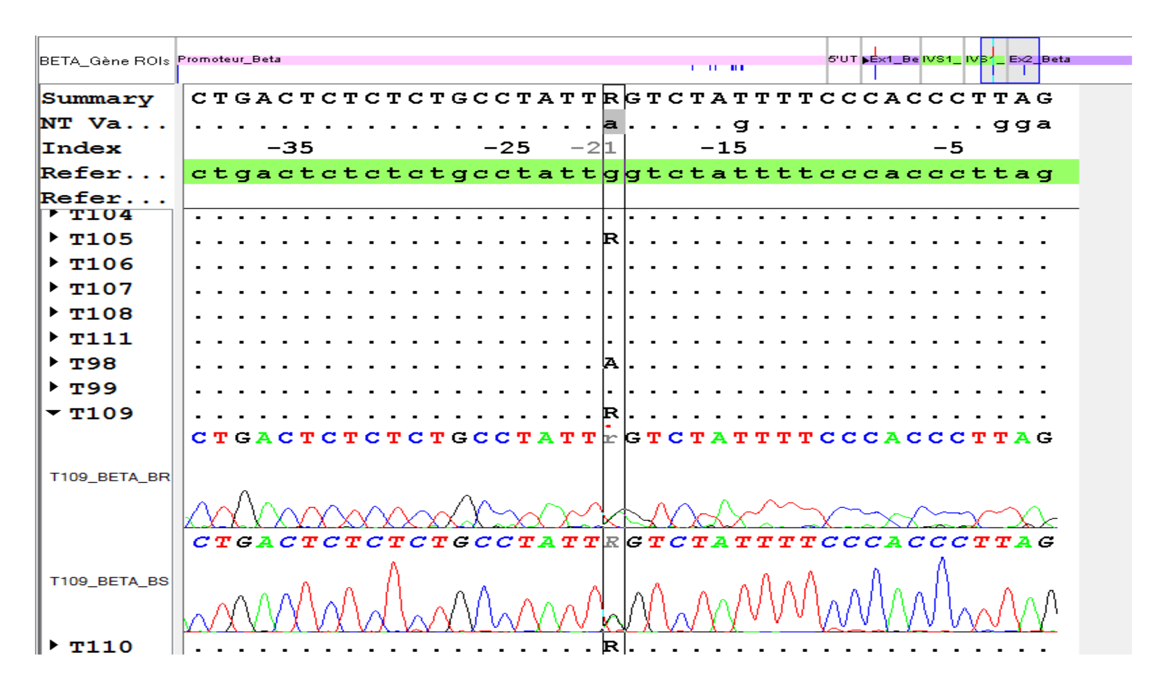


Figure 23: IVS-I-110 (G->A) beta+; the mutation is 21 nucleotides 5' to the acceptor splice site AG^GC: HBB: c.93-21G>A chez un patient hétérozygote

La Figure 34 représente la mutation IVS-I-1 chez un patient hétérozygote. Le remplacement de la base G par une base A dans la position 92+1 de la région intronique entre l'exon 1 et l'exon 2. Ce changement dans les deux premières nucléotides GT est très

important parce qu'ils représentent le site de la maturation physiologique de l'ARN pré-messager lors de la transcription.

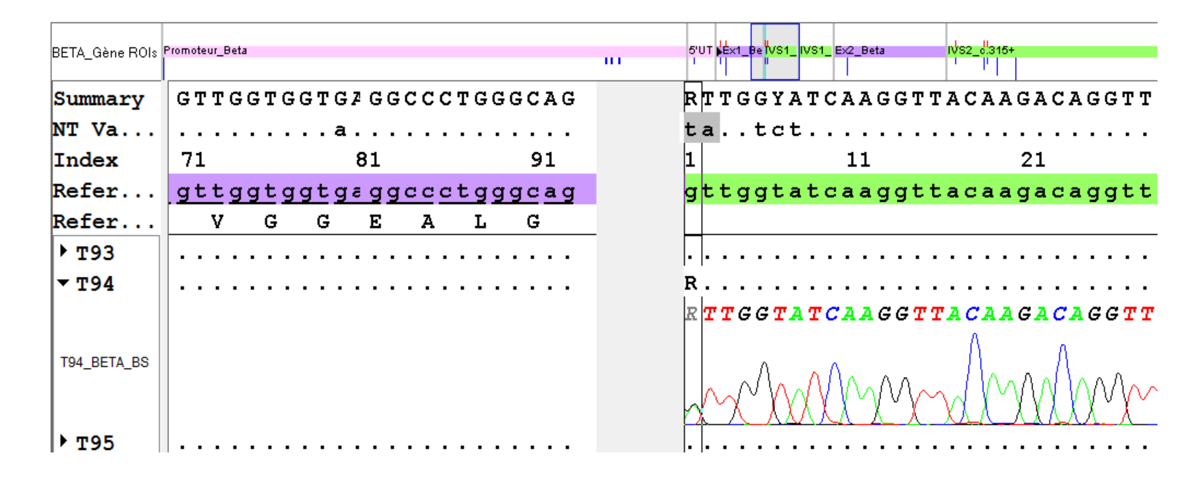


Figure 24: IVS-I-1 (G->A); AG^GTTGGT->AGATTGGT beta0: HBB: c.92+1G>A chez un patient hétérozygote.

La figure 35 illustre un exemple d'une mutation β^+ où la synthèse des chaines beta de l'hémoglobine n'est totalement arrêtée dans les mutations β°. La mutation -29 (A->G) beta+ présente un remplacement d'un nucléotide A par une G dans la position -79 dans la région promotrice UTR du gène de globine. Ce changement va causer une diminution de la transcription génétique de la bêta-globine en raison d'une liaison réduite des facteurs de transcription.

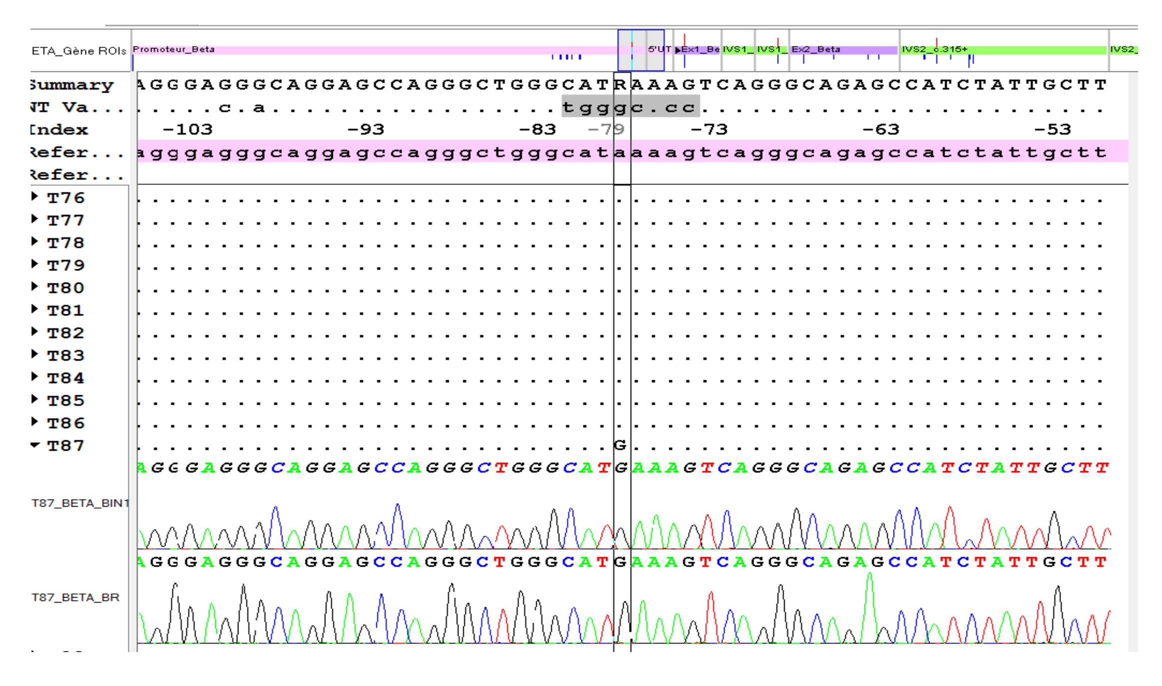


Figure 25: Un exemple de la mutation-29 (A->G) beta+ : HBB:c.-79A>G chez un patient homozygote

La figure 36 illustre la mutation du codon 6. Il s'agit d'une délétion d'un nucléotide A dans le codon 6 du gène de beta globine ce qui va engendrer un arrêt de la transcription dans le codon 18.

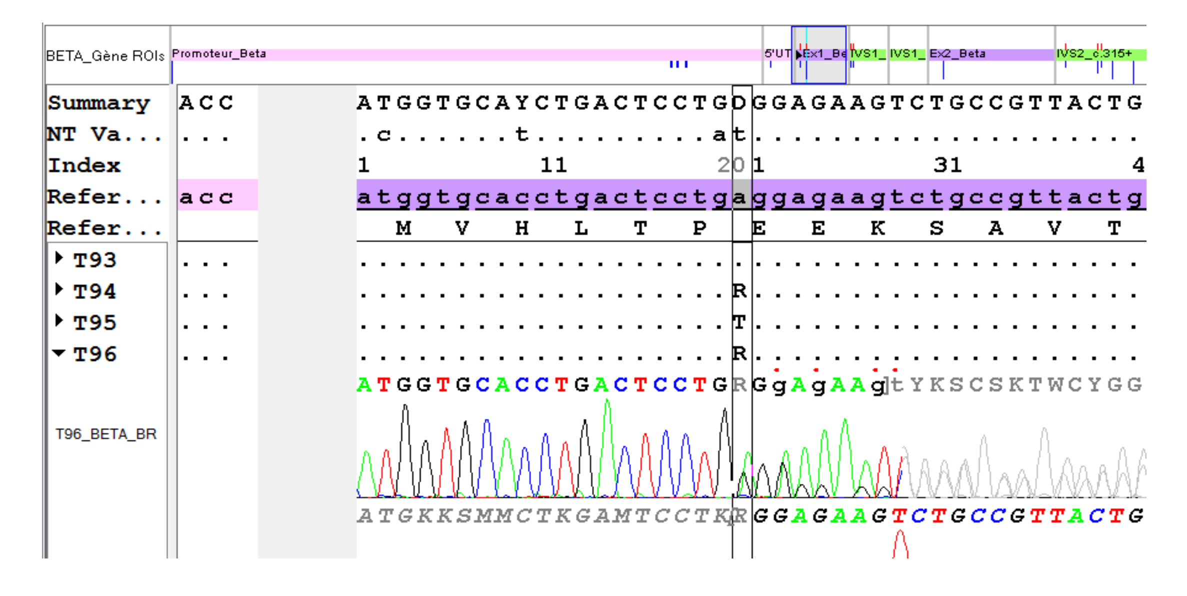


Figure 266: Un exemple de la mutation Codon 6 (-A); GAG(Glu)->G-G beta0: HBB:c.20delA chez un patient hétérozygote.

Pour faire le récapitulatif des résultats, le Tableau 9 montre la répartition géographique de l'ensemble des mutations β-thal identifiées dans la population d'étude par Séquençage Sanger avec leur fréquence alléliques (FA).

Tableau 9: Distribution et fréquences alléliques des mutations β-thalassémiques de la population d'étude en fonction de leur province d'origine.

Mutations β-thal (HBB)	**Population de β-TM et β-TI N=60 (FA=120)**	Annaba (N=34 et FA=68)	Guelma (N= 14 et FA=28)	Eltaref (N=12 et FA=24)	*p* value[a]
c.118C>T	52 (43%)	27	11	14	0.60
c.93-21G>A	31 (26%)	19	7	5	0.86
c.92+1G>A	12				
c.20delA	8				
c.25-26delAA	2				
c.92+1G>T	3				
c.-79A>G	4 (31%)	25	9	5	0.57
c.114G>A	2				
c.135delC	2				
c.92+6T>C	1				
c.316-3C>A	3				

HBB : chaine β-globine, FA : Fréquence Allélique.

[a]*p* value est déterminé par le test statistique Khi deux.

1.4.2. Résultats du génotypage du gène α globine et des QTLs de l'HbF

Le tableau 10 montre les résultats du génotypage du gène α globine et les délétions retrouvées dans la population β-thal étudiée par une multiplex GAP-PCR. Il illustre également les résultats du génotypage par plusieurs méthodes des différents polymorphismes (SNPs) impliqués dans la régulation quantitative en trans de la synthèse de l'HbF, qui est sous le contrôle de plusieurs locus (QTL).

Les principales délétions du gène α globine identifiées dans la population d'étude sont la délétion $-\alpha^{3,7}$ et la délétion $--^{MED}$. Les délétions alpha thalassémiques étaient assez rare avec seulement 11 alléles délétères sur 120 ; 10 patients hétérozygotes pour la délétion $-\alpha^{3,7}$ et un seul patient pour la délétion $--^{MED}$.

Tableau 10: Distribution et fréquences alléliques des mutations α-thalassémiques et des cinq polymorphismes des QTL de l'HbF de la population d'étude en fonction de leur province d'origine.

	Population de β-TM et β-TI N=60 (FA=120)	Annaba (N=34 et FA=68)	Guelma (N= 14 et FA=28)	Eltaref (N=12 et FA=24)	*p* value
Délétion α-globine					
$-\alpha^{3,7}$	10	4	3	3	0.58
$-(\alpha)^{20.5}$	0	-	-	-	
$--^{MED}$	1	1	0	0	0.68
Hb F QTLs					
rs7482144[a]	10 (0.08)	6	3	1	0.72
rs1427407[b]	19 (0.15)	13	1	5	0.19
rs10189857[b]	41 (0.34)	21	11	9	0.83
rs9399137[c]	22 (0.18)	16	3	3	0.37

QTLs: quantitative trait loci ; [a]XmnI polymorphism ; [b]BCL11A polymorphisms. [c]HMIP polymorphism. *p* value est calculé après le test statisitique Khi deux.

1.4.3. Résultats du calcul du TSS et corrélation avec les caractéristiques clinicobiologiques des patients

Les résultats du score calculé TSS ont divisé les patients β-thal en 4 classes selon le degré de sévérité de la maladie. Une corrélation statistique entre ces différentes classes avec les caractéristiques clinicobiologiques des patients est réalisée grâce à une analyse de variance à un seul facteur (ANOVA) et les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 11.

La corrélation de l'âge de la première transfusion et les différentes classes du TSS est statistiquement signifiante **(*p* value< 0.05).** Une tendance de signification statistique est observée aussi pour la splénectomie et le taux de ferritinémie avec les classes High et Very high du TSS score.

Tableau 11: Corrélation statistique des caractéristiques clinicobiologiques de la population d'étude avec les différentes catégories du score TSS (Thalassemia Severity Score)

Paramètres	Score Low severity (TSS<3) N=15	Score Mild severity (3<TSS<5) N=8	Score High severity (5<TSS<7) N=15	Score Very high severity (TSS>7) N=7	***p* value[a]**
<u>P. cliniques</u>					
Age de la 1ére transfusion (mois)	29 ± 31	57 ± 77	14 ± 10	8 ± 6	**0.004****
Sérologie HCV positive	1	1	2	2	0.95
Age de découverte (mois)	24 ± 27	30 ± 44	10 ± 7	11 ± 10	0.122
Splénectomie (N)					
Age de splénectomie (ans)	7	6	12	17	0.80
Intervalle de transfusion	12.1 ± 4.6	9.1 ± 3.0	10.4 ± 3.3	8.0 ± 3.3	**.072**
(semaines)					
	3.4 ± 1.4	3.0 ± 0.5	3.3 ± 0.6	3.1 ± 0.5	0.601
<u>P. biologiques</u>					
1ére visite de diagnostic					
Hb (g/dL)	6.4 ± 1.8	5.4 ± 2.9	6.0 ± 1.7	6.2 ± 1.8	0.739
HCT (L/L)	0.17 ± 0.07	0.20 ± 0.40	0.19 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.441
GB (109/L)	10.2 ± 10.2	16.8 ± 14.3	15.8 ± 13.4	24.7 ± 25.1	0.222
PLTs (109/L)	414 ± 327	346 ± 254	430 ± 280	508± 296	0.693
HbF (%)	76.0 ± 34.0	89.0 ± 11.0	89.0 ± 17.0	76.0 ± 28.0	0.59
Dernière visite avant transfusion					
Ferritine (µg/L)					
Bilirubine Totale	2806 ± 1780	2785± 1345	4699± 3496	4328 ± 2107	**0.091**
(µmol/L)	40.0 ± 24.0				
ASAT (UI/L)		36.0 ± 5.0	47.0 ± 29.0	32.0±27.0	0.427
ALAT (UI/L					

PAL (UI/L) Acide Urique (µmol/L)	42.0 ± 25.0 44.0 ± 26.0 337 ± 378 296 ± 125	55.0 ± 16.0 60.0 ± 21.0 375 ± 230 321 ± 114	46.0 ± 29.0 46.0 ± 39.0 305 ± 133 284 ± 137	45.0 ± 25.0 49.0 ± 31.0 286 ± 138 254 ± 108	0.731 0.703 0.818 0.728

TSS:Thalassemia Severity Score ; Hb :hemoglobin; HCT:hématocrite; GB:Globules blancs; PLTs:Plaquettes; ASAT: aspartate aminotransferase; ALAT: alanine aminotransferase; PAL:Phosphatase Alcaline; HCV:virus de l'hépatite C. [a] *p* value est déterminé par l'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Les valeurs sont exprimés soit en nombre da cas (N) ou en moyenne±écartype

Axe II : Caractérisation moléculaire des patients drépanocytaires

1. Résultats

1.1. Les caractéristiques épidémiologiques de la population d'étude

1.1.1. Age des patients

L'âge des patients drépanocytaires pendant la période de notre étude est illustrée dans la figure 37. L'âge des patients drépanocytaires varient entre 15 et 70 ans avec une moyenne d'âge de 33,36+/-12,20 ans. La catégorie d'âge majoritaire des patients est celle entre 15 et 25ans.

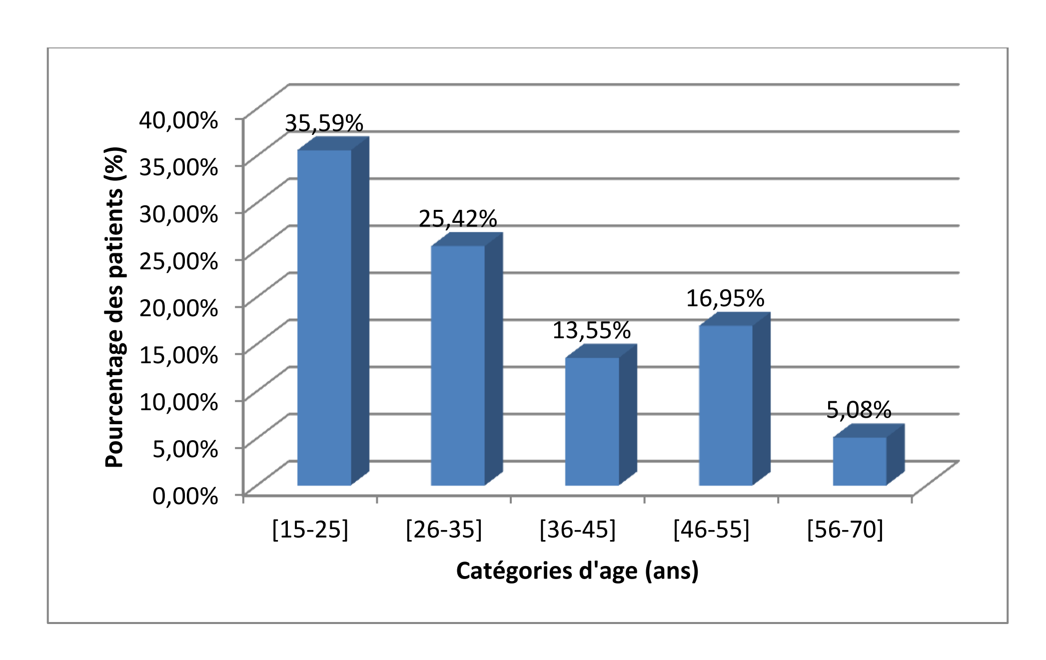


Figure 37: Répartition des patients de la population d'étude selon leur âge actuel

L'âge des patients au moment du diagnostic de la maladie est représenté dans la figure 38. La moyenne d'âge de diagnostic des patients drépanocytaires est 6,17+/-6,63ans. Pour la majorité des patients, à savoir 17 cas, soit 28,8%, l'âge du diagnostic est situé entre 0 et 2 ans.

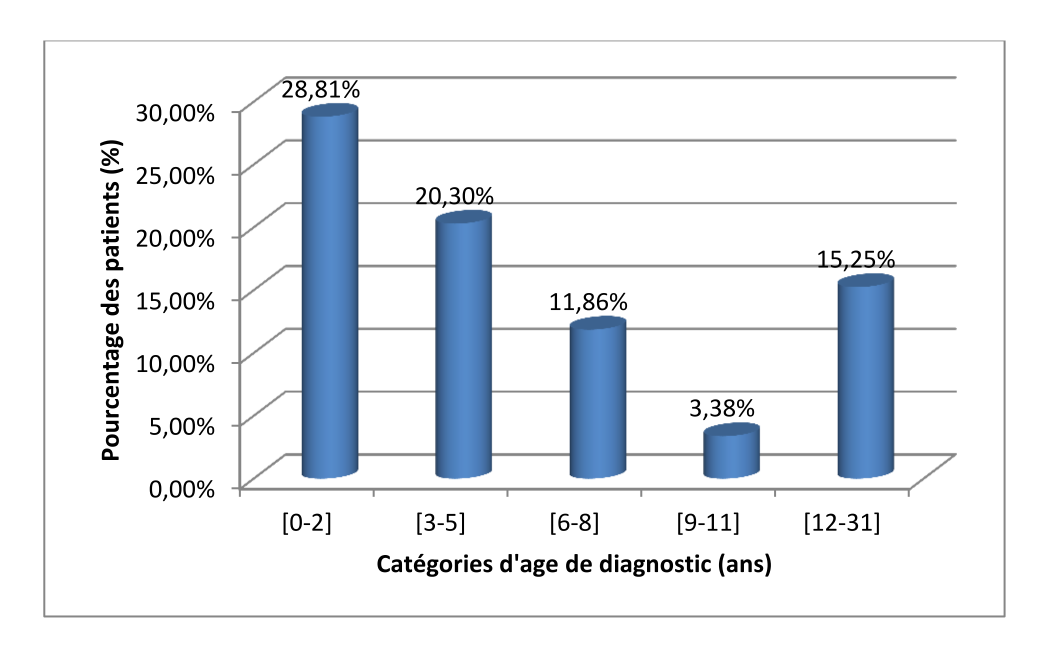


Figure 38: Répartition des patients de la population d'étude selon l'âge de découverte de la maladie

1.1.2. Sexe des patients

La répartition des patients de la population drépanocytaire selon le sexe est illustrée dans la figure 39. Nous soulignons une prédominance féminine avec un sexe ratio (M/F) de 19/40.

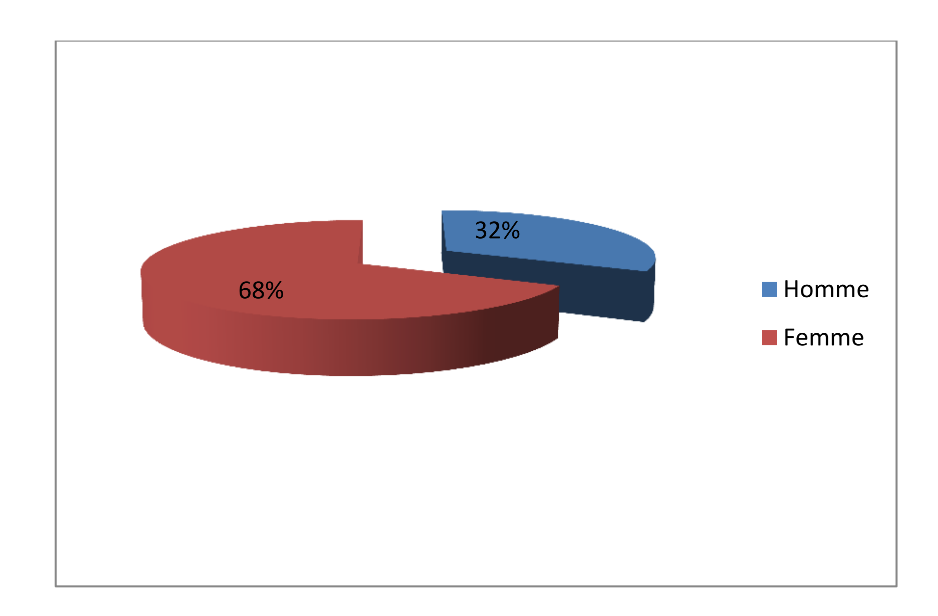


Figure 39: Répartition des patients de la population d'étude selon le sexe

1.1.3. Origine géographique des patients

La figure 40 représente la répartition des patients selon leur origine géographique. Vu que l'étude a été réalisé et les patients ont été recrutés au niveau du service d'hématologie CHU Dorban Annaba, on note une prédominance des patients originaires de la région.

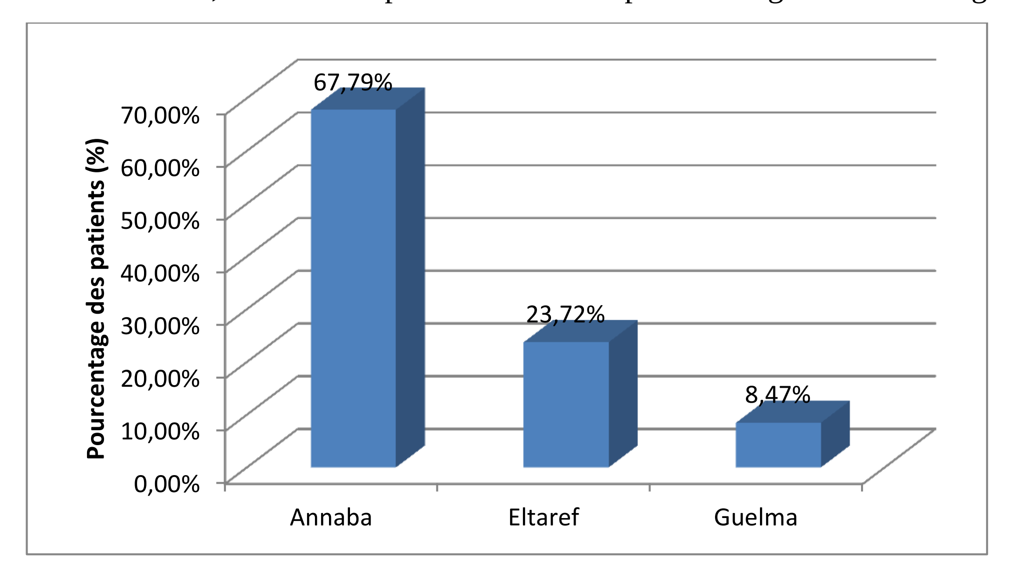


Figure 27: Répartition des patients de la population d'étude selon leur origine géographique

1.1.4. Répartition des patients en fonction de la présence de la consanguinité et des cas similaires dans la fratrie

Le nombre de patients issus d'un mariage consanguin et non consanguin est illustré dans la figure 41. Les patients issus d'un mariage consanguin représentent 44%, alors que les patients issus de mariage non consanguin représentent 66%.

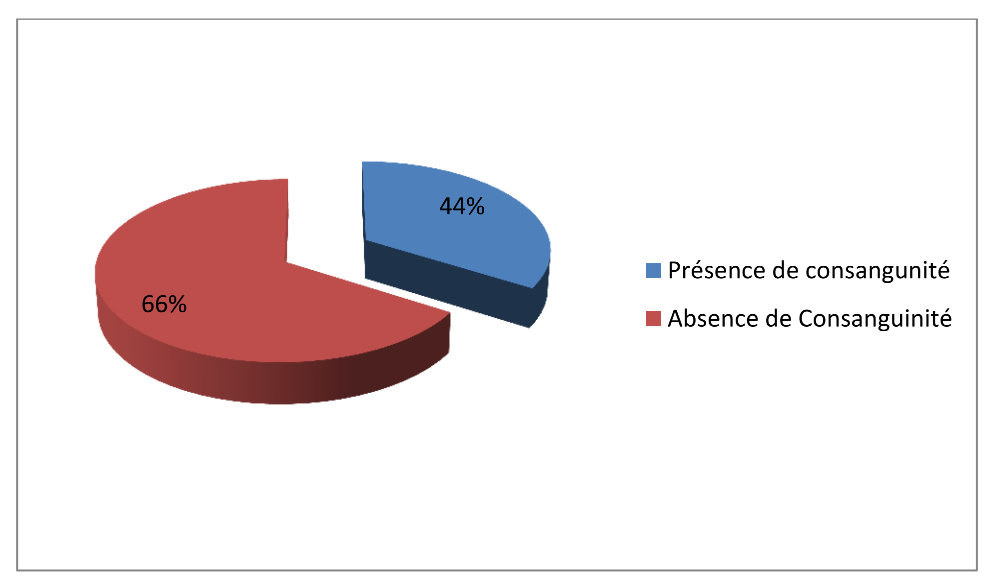


Figure 28: Répartition des patients de la population d'étude selon la présence de la consanguinité

La figure 42 représente la répartition des patients selon la présence des cas similaires dans la fratrie. On note une légère prédominance des patients qui n'ont des antécédents familiaux par rapport à ceux qui y ont.

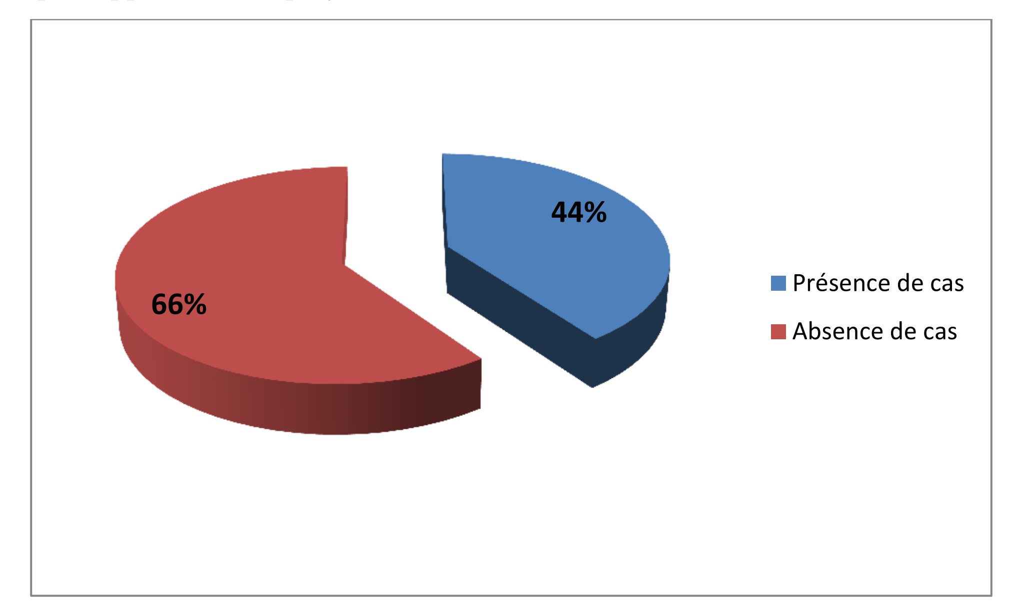


Figure 42 : Répartition des patients de la population d'étude selon la présence de cas similaires dans la fratrie.

1.2. Caractéristiques cliniques de la population d'étude

1.2.1. Répartition des patients en fonction de la réalisation de la splénectomie

La figure 43 représente la répartition des patients drépanocytaires selon la réalisation d'une splénectomie au cours de la vie des patients ou non. On observe une grande prédominance des patients non splénectomisés par rapport aux autres.

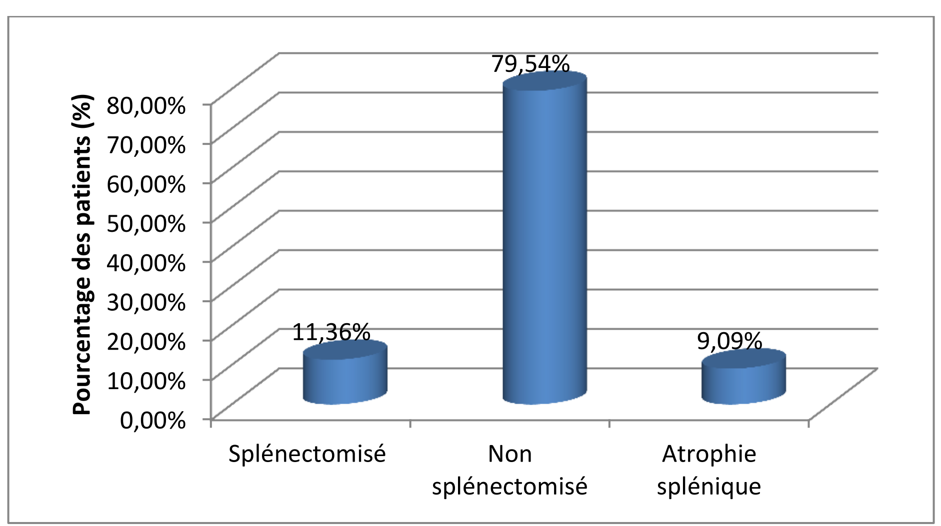


Figure 29: Répartition des patients de la population d'étude selon la réalisation d'une splénectomie.

1.2.2. Prévalence des cas de sérologie HCV positif dans la population d'étude

La figure 44 représente le nombre de cas de sérologie HCV positif dans la population d'étude. On note la présence de 7 cas de sérologie HCV positive sur une population de 59 patients ce qui représente un pourcentage de 11.8% des patients.

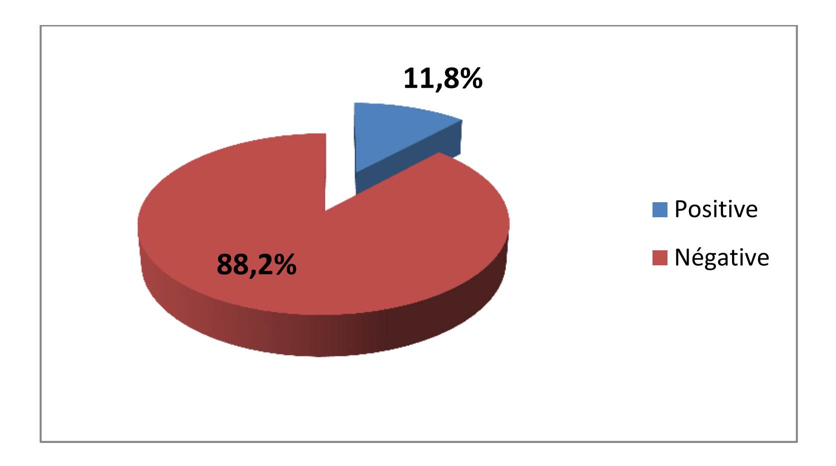


Figure 44 : Répartition des patients de la population d'étude selon le statut de la sérologie hépatite C

1.2.3. Répartition des patients en fonction de nombre de crises vaso-occlusives par an

Les crises vaso-occlusives (CVO) sont les principales complications rencontrés chez un patient drépanocytaire. La figure 45 montre la répartition des patients en fonction de nombre de CVO qu'ils font par an. On observe une prédominance de la catégorie de patients qui présente une ou moins de CVO par an.

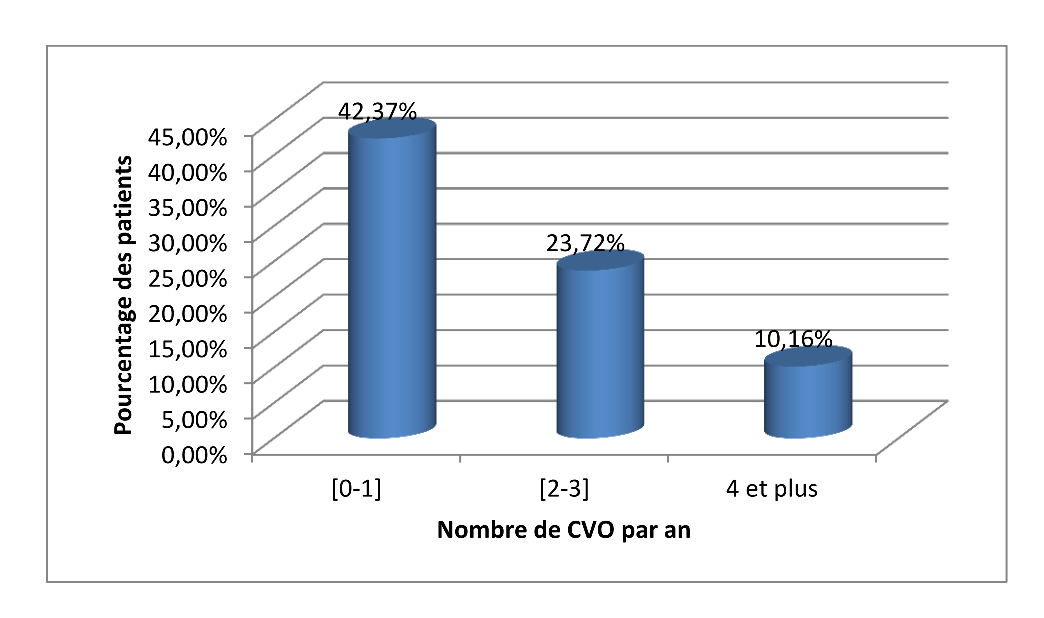


Figure 30: Répartition des patients de la population d'étude selon le nombre de crises vaso-occlusives (CVO) par an

1.2.4. Répartition des patients en fonction du phénotype du patient (Homozyogte/Hétérozygote)

La répartition de la population d'étude selon le phénotype du patient (homozygote/ hétérozygote) est illustrée dans la figure 46. Une prédominance des homozygotes est remarquée par rapport aux hétérozygotes avec un pourcentage de 72.88% pour les homozygotes et de 27.12% pour les hétérozygotes.

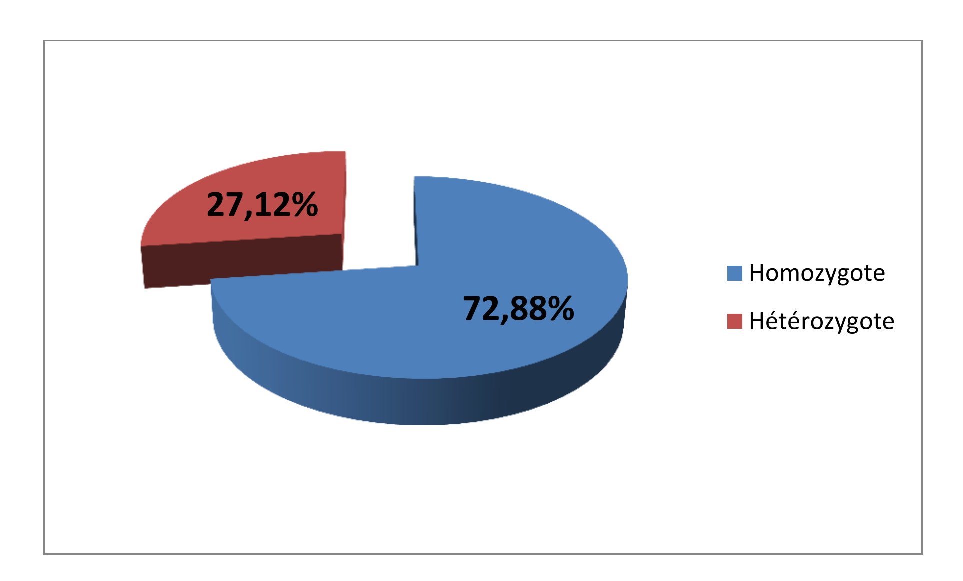


Figure 31: Répartition des patients de la population d'étude selon le phénotype du patient (homozygote/hétérozygote)

1.3. Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques de la population drépanocytaire

Les principales caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques de la population drépanocytaires sont résumées dans le Tableau 12. L'âge moyen de la population d'étude est 33.3 ± 12.2 ans alors que le sexe ratio est 19H/40F. La présence du mariage consanguin est de l'ordre de 20 sur 59 patients c'est à dire un pourcentage de 33.9%.

L'âge moyen de découverte de la maladie est 6.1 ± 6.6 ans. 5 patients sur 59 ont été splénectomisé. 7 patients sur 59 avaient une sérologie positive pour le virus de l'hépatite C (HCV). La moyenne du nombre de CVO par est de l'ordre de 1.6 ± 1.1.

Lors de la première visite de diagnostic, les paramètres de la FNS (Numération de la formule sanguine) dont l'Hb, l'hématocrite et VGM sont très diminués par rapport aux valeurs normales. Le taux moyen des GB et des plaquettes est dans les normes internationales. Dans l'électrophorèse de l'Hb réalisé pour les patients, le taux moyen de l'HbS des patients drépanocytaires est assez élevé et de l'ordre de 80.6 ± 19.9 %.

Les paramètres biochimiques observés sont recensés lors de la dernière visite médicale de surveillance des patients. La ferritinémie moyenne est de l'ordre 928.3 ± 1411.2 µg/L qui est élevée par rapport aux valeurs normales de la férritine. Le taux moyen de la bilirubine totale est également supérieur aux valeurs normales. Les taux des transaminases ASAT et ALAT sont élevés et aussi l'enzyme hépatique phosphatase alcaline (PAL) est très augmentée. La valeur de l'acide urique est dans les normes internationales.

Tableau 12: Les caractéristiques épidémio-clinico-biologiques de la population drépanocytaire

	Population drépanocytaire (N=59)
Paramètres épidémiologiques	
Age (ans)	33.3 ± 12.2
Sexe	19 H / 40 F
Consanguinité	28.8
Paramètres Cliniques	
Age de découverte (mois)	6.1 ± 6.6
Splénectomie	8.5
Sérologie HCV	11.9
Nombre de CVO par an	1.6 ± 1.1
Paramètres Biologiques	
1ére visite de diagnostic	
Hb (g/dL)	7.4 ± 1.3
HCT (L/L)	21.7 ± 4.7
GB (10^9/L)	17.5 ±19.0
PLTs (10^9/L)	366.5 ± 195.6
HbS (%)	80.6 ± 19.9
Dernière visite avant transfusion	
Ferritine (µg/L)	928.3 ± 1411.2
Bilirubine Totale (µmol/L)	39.7 ± 37.6
ASAT (UI/L)	45.7 ± 21.1
ALAT (UI/L	23.6 ± 13.1
PAL (UI/L)	191.6 ± 131.4
Acide Urique (µmol/L)	130.0 ± 125.9

Les valeurs en exprimés soit en nombre de cas (N) soit en moyenne ± écart-type. TM :Thalassémie Majeure ; TI : Thalassémie Intermédiaire ; Hb: Hemoglobine; HCT: Hématocrite; GB: Nombre de Globules blancs; ASAT: aspartate aminotransférase; ALAT: alanine aminotransférase; ALP: alcaline phosphatase; HCV: virus de l'hépatite C.

1.4. Les caractéristiques génotypiques de la population d'étude

Les résultats de l'analyse génotypique des patients drépanocytaires et leur répartition en fonction de la région géographique sont résumés dans le tableau 13. Le séquençage direct

de Sanger a permis le génotypage de tous les patients drépanocytaires. Il a permis aussi de faire la différence entre les patients drépanocytaires homozygotes SS et les patients qui présentent un syndrome thalasso-drépanocytaire S/ β thal.

Les principales mutations β-thal retrouvées dans ce patients sont la mutation codon 39 (HBB : c.118C>T), HBB : c.20delA, HBB : c.92+1G>A, HBB : c.25_26delAA, HBB : c.93-21G>A et une nouvelle mutation identifiée pour la première fois au cours de l'étude **HBB : c.374-375insC.**

Les résultats de l'étude du gène α globine ont révélé la présence de deux délétions alpha thalassémiques qui sont la délétion $-\alpha^{3.7}$ (2 allèles) et la délétion $-(\alpha)^{20.5}$(un seul allèle).

Les résultats de l'étude des polymorphismes (SNPs) des QTL de l'HbF ont montré la présence de 7 allèles du polymorphisme Xmn1, 19 allèles du polymorphisme BCL11A 2p07 et 21 allèles du polymorphisme BCL11A 2p57.

Tableau 13: Distribution et fréquences alléliques des mutations α et β thalassémiques et des QTLs de l'HbF des patients drépanocytaires en fonction de leur province d'origine.

Mutations (HBB)	Population drépanocytaire globale (N=59patients, FA=118)	Annaba (N=40 patients, FA=80)	Guelma (N=5 patients, FA=10)	Eltaref (N=14 patients, FA=28)	*p* value
Génotype drépanocytaire					
SS	102	54	8	27	0.87
S/β thal :	16	26	2	1	0.67
c.118C>T	8				
c.20delA	3				
c.92+1G>A	2				
c.25_26delAA	1				
c.93-21G>A	1				
c.374-375insC[*]	1				
Délétions α-globine					
$-\alpha^{3.7}$	2	1	0	1	0.56
$-(\alpha)^{20.5}$	1	0	0	1	0.34
QTLs de l'HbF					
XmnI (rs7482144)	7	7	0	0	0.67
BCL11A:					
2p07 (rs1427407)	19	14	2	3	0.34
2p57(rs10189857)	21	16	3	2	0.98

1.5. Présentation de la nouvelle mutation identifiée

Une nouvelle mutation β thalassémique était identifiée chez un patient qui présente un syndrome thalasso-drépanocytaire (Figure 47). Elle représente une insertion de la base cytosine dans la position 374 de la séquence nucléotidique.

Le patient chez lequel on a découvert cette nouvelle mutation présente une anémie microcytaire hypochromique régénérative et qui n'est pas associé avec une délétion alpha thalassémique prsente l'hémogramme suivant : Hb 6.6 g/dL, le volume globulaire moyen (VGM) 72.8 fL, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) 18.9 pg, la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) 29.9 g/L et les plaquettes à 321.10^9/L.

Cette nouvelle mutation est ajoutée à la base de données des mutations β thalassémiques HbVar pour enrichir cette dernière avec les derniers résultats retrouvés.

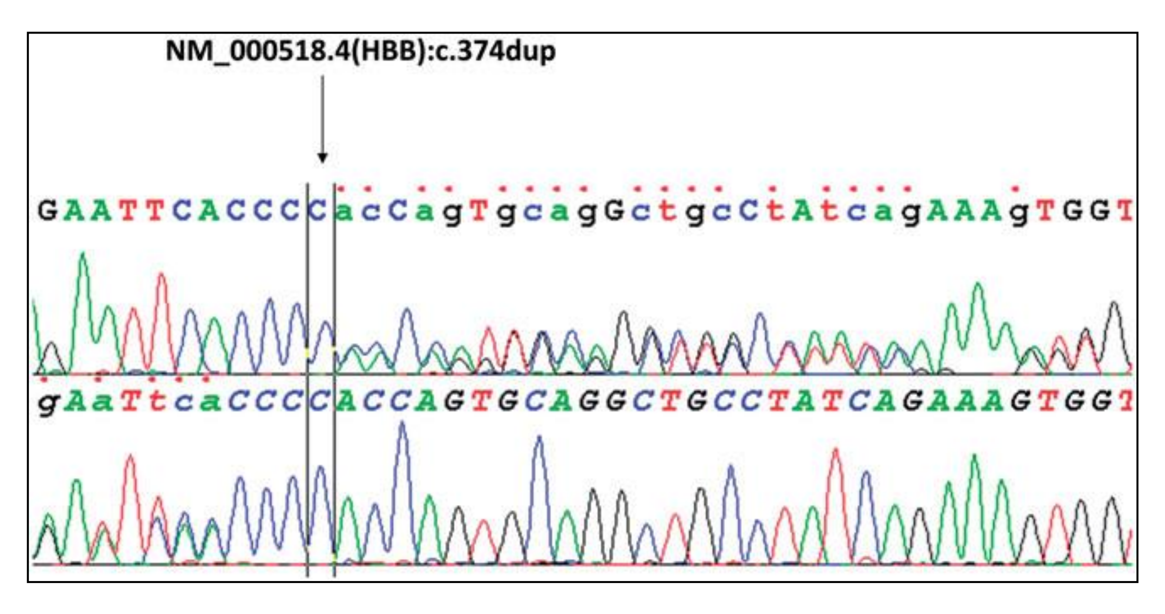


Figure 47: Séquençage directe de Sanger de la nouvelle β-thal mutation identifiée : un décalage du cadre de lecture sus-nommé (HBB: c.374dup; p.Pro126Thrfs_15).



Discussion

Axe I : Caractérisation moléculaire des patients beta-thalassémiques

1. Répartition selon l'âge actuel, de diagnostic et de la première transfusion

La moyenne d'âge actuel des patients β-thalassémiques recrutés dans notre étude est 22.8 ± 4.8 ans avec intervalle allant de 15ans jusqu'à 37ans. Ces résultats sont en concordance avec celle de Grifi et al, 2017 qui a recensé une population avec un âge moyen de 18.21±9ans.

La répartition des patients selon leurs tranches d'âge de diagnostic montre que la β-thalassémie est une maladie à révélation pédiatrique, elle se déclare dès la petite enfance et les complications apparaissent au fur et à mesure de l'évolution. Dans nos résultats, l'âge moyen du diagnostic est de 17 ± 23 mois avec des extrêmes allant de 2 mois à 10 ans qui est en concordance avec les résultats de Grifi et al, 2017 dont l'âge moyen est 16.7±14.32 mois. Cependant, selon Lahlou, 2016, Bedir et Miloudi, 2006, l'âge moyen du diagnostic est de 5ans et Romdhane et *al*. 2014 indique, par contre, un âge moyen de 9 ans dans la population tunisienne avec des extrêmes allant de 2 à 17 ans. On peut dire que le diagnostic est fait assez précocement et ceci grâce à la bienveillance des parents, surtout s'ils se savent porteurs d'une β thalassémie mineure, ou s'ils ont des enfants, ou des cas de β thalassémie dans la famille et grâce aux professionnels de la santé qui posent le diagnostic le plus précocement possible afin d'instaurer un programme transfusionnel adéquat le moment voulu (Chevet, 2015).

La moyenne d'âge de la première transfusion est 22 ± 35 mois avec une prédominance dans la catégorie d'âge de la première transfusion est située entre 0 et 12 mois. Ces résultats sont différents de ceux retrouvés chez Boucherit et *al*, 2017 qui ont présenté une moyenne d'âge de transfusion de 3,3ans. Ce qui peut être dû à la présence d'un nombre de cas élevé de patients atteint de la β thalassémie intermédiaire qui présente un âge de transfusion plus tardif par rapport à la β thalassémie majeure. L'âge précoce de transfusion observé chez la population d'étude est expliqué aussi par la sévérité de la maladie chez les patients β-thalassémiques qui appartiennent principalement à la forme majeure de la β thalassémie.

2. Répartition selon le sexe

Les résultats obtenus sont analogues à ceux obtenues par Tensaout F, 2017, Haddad et Bradai, 2016 et Sall *et al*. 2014 rapportant une légère prédominance féminine avec un sexe ratio respectivement de 1.3 et 0.87. La prédominance féminine ne peut pas être expliquée par une relation entre le sexe et la maladie puisque sa transmission est autosomique récessive c'est à dire qu'elle touche les deux sexes de façon égale (Bedir et Miloudi, 2006). Nos résultats sont

différents de ceux obtenus par Djamaa, 2013 et Romdhane, 2014 et Grifi et al. 2017 soulignant une prédominance masculine dans leurs études.

3. Répartition des patients de la population d'étude selon leur origine géographique

Vu que l'étude a été réalisée au niveau du service d'hématologie CHU Dorban Annaba, on note une prédominance des patients originaires de la région d'Annaba par rapport à d'autres régions. D'après nos résultats, 35 patients sont originaires d'Annaba. Ces résultats ne peuvent refléter la réelle répartition des hémoglobinopathies dans la région du nord-est algérien vu le nombre restreint de patients recrutés et chez qui le questionnaire a pu être réalisé dans les autres wilayas.

4. Le taux de consanguinité et la présence des cas similaires dans la fratrie

Dans notre étude, les patients issus d'un mariage consanguin représentent 46,6% de la population globale alors que les patients issus de mariage non consanguin représentent 53,3%. Ces résultats sont appuyés par ceux de Bedir et Miloudi, 2006 et Djamaa, 2013 et Grifi et al. 2017 avec des taux de consanguinité respectivement de 68% et de 61% et 49.3%. Par ailleurs selon Djenouni et *al*, 2002 ; dans une étude allant de 1995 à 2002, 23% des patients du CHU Annaba ont un antécédent de consanguinité. Nos résultats sont en accord aussi avec d'autres études réalisées au Maroc qui ont retrouvés un pourcentage de consanguinité de 24,7% (Laghmami R, 2018).

La consanguinité seule, ne semble pas être la cause principale de la thalassémie mais elle augmente la probabilité de l'apparition de la maladie. Sa fréquence élevée dans les pays du Maghreb est expliquée par la fréquence élevée des mariages consanguins dans ces régions. Le nombre d'enfants thalassémiques dans une seule famille peut avoir des répercussions significatives sur la prise en charge des malades. Plus il y a d'enfants malades, plus les charges sont élevées, plus il y a des décès (Bener et al, 2019).

Dans notre étude, 31 patients, soit 51.66% des cas ont un autre membre dans la fratrie atteint de thalassémie. Dans l'étude de Djenouni et *al*. 2002, 39,5% des cas similaires dans la fratrie ont été également rapportés. Nos résultats sont aussi en accord avec une étude réalisée à Merrakech où ils ont trouvé 48,2% d'antécédents familiaux de l'anémie (Laghmami R, 2018).

5. Profils cliniques et biologiques des patients β-thalassémiques

Les résultats de la réalisation de la splénectomie représentent environ 73% de la population d'étude. Ils sont analogues à celles retrouvées chez Grifi et al. 2017 et Tahar et al.

2008 (78% et 79.8% respectivement). L'âge de moyen de la splénectomie (9ans± 3.7 ans) est très proche de celui retrouvé par Grifi et al. 2017 : 11.37ans avec un intervalle allant de (3-31ans).

L'intervalle transfusionnel est différent d'un patient à un autre en fonction de la gravité de l'anémie. 65% des patients appartiennent à la catégorie d'un intervalle régulier entre deux transfusions (3 semaines). Ces résultats sont en concordance avec celle mentionné par Grifi et al. 2017 qui ont montré que 96% des patients suivent un programme transfusionnel régulier. Le Hb moyen pré transfusionnel de Grifi et al. 2017 est 8.5g/dL qui est un peu élevé par rapport à celui retrouvé dans notre population. Ce qui peut être expliqué par plusieurs facteurs qui peuvent influencer le rythme transfusionnel comme la discipline des patients et le respect des rendez-vous données par le service, la disponibilité des donneurs et des poches de sang et finalement la rapidité de la préparation des culots globulaires appropriés par le centre de transfusion sanguine (CTS Annaba) (Klein et al. 2007).

10% des patients β-thal étudiés présentent une sérologie hépatite C positive. Nos résultats sont très proches avec ceux retrouvé par Grifi et al. 2017 qui ont élucidé 14% de sérologie HCV positive, 0.3% se sérologie HBV positive et aucun cas d'HIV positif. La transmission du VHC peut se faire principalement par transfusion sanguine. L'incidence de l'hépatite C chronique était plus élevée chez les patients atteints de thalassémie transfusés avant 1992, lorsque le dépistage des donneurs de sang n'était toujours pas disponible. De nos jours, la transmission du VHB et du VHC par transfusion est rare en raison du dépistage obligatoire des produits sanguins. La transmission du VHB par la mère au nourrisson, le contact sexuel ou le contact étroit avec une personne contaminé est encore fréquente dans la zone intermédiaire ou endémique élevée. Enfin, l'utilisation de drogues par voie intraveineuse avec des aiguilles contaminées est une autre cause courante d'infection par le VHB et le VHC (Di Marco *et al,* 2010).

La prédominance des homozygotes est remarquée par rapport aux hétérozygotes avec un pourcentage de 58.33% pour les homozygotes et de 41.67% pour les hétérozygotes. Ces résultats ne sont pas en accord à ceux retrouvés chez (Boukoftane *et a,l* 2019) qui a confirmé la présence de 16 cas de β-thalassémiques homozygotes et 18 cas β-thalassémiques hétérozygotes. Mathématiquement, on peut affirmer que la forme β-thal hétérozygote est plus fréquente que la forme homozygote. Cela peut être justifié par le fait que la fréquence d'avoir des descendants homozygotes à partir de parents hétérozygotes est 25% par rapports à 50% de descendants hétérozygotes, selon le mode de transmission autosomique récessive.Ces

résultats semblent être superposables aux données fournies par l'enquête épidémiologique établis à Alger (BenMaamer *et al*, 2009).

Le thalassemia severity score (TSS) est une score génétique compilant dans un algorithme le sexe, le génotype β, le génotype α (nombre de gènes alpha fonctionnels) et les résultats de génotypage des SNPs *XmnI*, rs1447407 et rs10189857 sur *BCL11A* et rs9399137 sur *HBS1L-MYB*. Ce score est calculé en ligne via un algorithme proposé par des chercheurs européens. Une prédominance des patients est observée pour la classe « Very High » qui représente une classe où la valeur du TSS est supérieure à 7. Ce qui déduit le degré de sévérité de la maladie observé chez la population β-thal étudiée. La gravité de la beta thalassémie chez ses patients est expliquée par le nombre de mutations β° thalassémiques présentes chez eux. Ces mutations β° engendre une absence totale de la synthèse de la chaine β d'Hb et un profil clinique plus vulnérable et dépendant de la transfusion mensuelle (Danjou et al. 2016).

Nos résultats sont analogues à ceux de Haddad et Bradai, 2016 rapportant la présence d'une anémie microcytaire chez les enfants avec les taux moyens suivants : Hb de 6,7 g/dL, VGM 62,84 fL et GR 5.22 $x10^6/\mu L$. Les résultats publiés par Dogaru *et al.* (2011) ont par ailleurs, montré que les taux d'HbA2 varient entre 3.5 et 7.8%. Sall *et al.* (2014) expliquent la microcytose par la survenue d'une déficience lors de la synthèse de l'Hb, aboutissant à une réduction de sa concentration cytoplasmique et à une augmentation du nombre de mitoses afin de poursuivre une certaine maturation de l'érythroblaste. Cette microcytose est souvent accompagnée d'une hypochromie et constitue un signe biologique évocateur d'une hémoglobinopathie telle la β-thalassémie. Dans l'électrophorèse de l'Hb réalisé pour les patients, le taux moyen de l'HbF des patients β-thalassémiques est 82.0 ± 24.0%. Des résultats très proches sont observé chez Boukoftane et al, 2019 avec une moyenne du taux de l'HbF de (79.83±25%). Par contre, d'autres études ont trouvés dans leurs séries une expression moins forte de l'Hb F, ils ont rapporté, respectivement des moyennes de 9,1% ±2,3 et 9,5% ± 8,3[(Dahmani et al, 2017) et (Doupa et al, 2017)]. L'augmentation du taux d'HbA2 est la conséquence d'une augmentation relative de la proportion des chaînes δ-globine par rapport aux chaînes β-globine (Joly P, 2014).

La surveillance paraclinique de la surcharge en fer dans la thalassémie majeure se fait par le dosage régulier de la ferritine chaque 3 mois. Le taux moyen de la ferritinémie est égal à 3836 ug/L. Ces résultats sont presque identiques au taux moyen trouvé par Grifi et al, 2017 (3281ng/L). Lorsque le traitement chélateur est débuté précocement, les complications cliniques de la surcharge en fer n'apparaissent pas avant l'âge adulte et l'espérance de vie

dépasse alors 40 ans. Les complications cardiaques représentent la cause de décès la plus fréquente (environ 71 %) des patients TM. Néanmoins, la diversification récente des traitements chélateurs et des outils d'évaluation radiologique de la surcharge en fer (notamment par IRM cardiaque et hépatique) permettent d'en espérer une prise en charge plus précoce et une augmentation de l'espérance de vie des patients (Olivieri *et al*, 2009).

La surveillance des complications hépatiques de la beta thalassémie est réalisée chaque trois mois pour les patients. Les taux des transmainases ASAT et ALAT sont élevés et aussi l'enzyme hépatique phosphatase alcaline (PAL) est très augmentée. Le taux moyen de la bilirubine totale est également supérieur aux valeurs normales.

6. Génotypage du gène β-globine chez les patients thalassémiques

Selon le premier objectif fixé, l'analyse moléculaire du gène de la beta globine a permet de confirmer la grande hétérogénéité des mutations β-thal en Algérie avec plus de 10 mutations β-thal différentes répertoriées (Addour et al. 2009).

Toutefois, les deux principales mutations trouvées [β° Codon 39 (C>T) et β IVS-I-110 (G>A)] représentaient plus de 69,0 % des allèles β-thal analysés, ces résultats sont très semblables à ceux qui ont été signalé précédemment pour des populations algériennes (52,3 %) (Addour et al. 2009) et tunisiennes (62,2 %) (Labie et al. 1995; Jouini et al. 2013). La mutation β° Codon 39 est très répandue dans les environs d'Oran (Bouhass et al. 1995). Elle peut provenir de l'ancien empire romain, lors de sa large répartition dans le bassin méditerranéen (Labie et al. 1995).

La mutation IVS-I-110 est la β-thal mutation la plus fréquente dans la population turque. Sa répartition est étroitement liée à la diffusion géographique de l'Empire ottoman entre les XVI et XIX siècles en Afrique du Nord (Kurtoglu et al. 2017).

Les autres mutations identifiées

Ces deux mutations peuvent être facilement identifiées par des méthodes simples basées sur la PCR, telles que le système de mutation réfractaire d'amplification (ARMS) basé sur l'amorçage spécifique à l'allèle (Perrin et al. 1998 ; Khelil et al. 2003 ; Omar et al.2005).

Un autre moyen simple et fiable pour les laboratoires sans accès au séquençage de Sanger est l'utilisation du kit d'hybridation Stripassay MED (Viennalab Diagnostics Gmbh) qui permet le génotypage des 22 des mutations β- thal les plus fréquentes dans le bassin méditerranéen (Soliman et al. 2010). Si elle avait été appliquée à la population d'étude de 60 patients de β thalassémie majeur ou β-thalassémie intermédiaire, elle aurait identifié tous les mutations des différents β-thal allèles, sauf trois [HBB : c.92 1G>T, HBB : c.79A>G (Hb E)

et HBB : c.114G>A], qui correspondaient à 111 allèles sur 120 (92,5 %). Cinquante et un patients sur 60 auraient été entièrement génotypés pour leur profil de β thalassémie.

7. Génotypage du gène alpha globine et les QTLs de l'HbF chez les patients thalassémiques

La fréquence allèlique pour le gène α-thalassémique est 11/120 allèles soit disant 9% de la population thalassémique globale et pour le polymorphisme Xmn1, la FA est 10/120 soit disant 8%. Ces résultats confirment les données déjà retrouvées en Afrique de Nord : 4.6% pour l'alpha thalassémie en Algérie (Mesbah-Amroun et al. 2008) et 8.3% pour le Xmn1 dans une population égyptienne (Said et al. 2015).

D'autre part, notre étude est la première à avoir étudié les polymorphismes des QTLs de l'HbF BCL11A et HMIP dans une population nord-africaine. Globalement, les résultats de la recherche de ces SNPs au niveau de notre population d'étude ont montré une fréquence allèlique assez faible des gènes modificateurs de la sécrétion de l'HbF par rapport aux études européennes et italiennes surtout. Cela suggère fortement une plus grande sévérité clinique pour les patients β thalassémiques homozygotes originaire du Maghreb qui est bien explicite par le nombre des mutations β° thalassmiques par rapport à ceux retrouvées à l'Italie et la Sardaigne (Danjou et al. 2012).

Aucune différence statistique significative dans la fréquence allélique n'a été observée dans les trois wilayas du nord-Est de l'Algérie, tant pour les différents mutations β-thal, α-thal et pour les quatre génes du QTLs de l'HbF étudiés. Dans la pratique, cela signifie qu'il n'ya pas d'effet fondateur dans une province qui pourrait avoir entrainé la surreprésentation d'un génotype particulier.

8. Corrélation des caractéristiques clinicobiologiques en fonction de la région d'origine

Les données cliniques des patients β-thal de l'étude confirment cette affirmation car elles présentent un très faible taux moyen d'Hb (6,1 g/dL), un très jeune âge de première transfusion (environ 2 ans) et un régime transfusionnel fort (toutes les 3 semaines) menant à une hypertransfusion majeure ferritinemia (>2500.0 lg/L). Ce dernier point souligne la quasiabsence de la chélation au Maghreb, qui représente un réel problème pour le suivi à long terme des patients b-TM en Algérie.

La fréquence assez élevée des patients atteints du VHC (10/60, 10,0%) est également à noter en raison d'une sécurité transfusionnelle insuffisante au Maghreb.

Malgré des différences évidentes dans les équipements médicaux (médecins qualifiés et approvisionnement en médicaments) dans les trois provinces du nord-est de l'Algérie, aucune différence n'a été observée dans l'évolution clinique de b-TM patients, une conclusion répondant à notre deuxième objectif tel qu'établi ci-dessus.

9. Corrélation entre les différentes catégories du score TSS avec les caractéristiques clinicobiologiques des patients

Depuis quelques années, plusieurs équipes ont étudié le génotype de ces 3 loci en complément des statuts alpha et bêta-globine et l'ont corrélé à la sévérité de la forme clinique (intermédiaire ou majeure) chez des patients β- thalassémiques intermédiaires ou majeurs. Danjou et Galanello ont montré que, en compilant dans un algorithme le sexe, le génotype β, le génotype α (nombre de gènes alpha globine fonctionnels) et les résultats de génotypage des SNPs *XmnI*, rs1447407 et rs10189857 sur *BCL11A* et rs9399137 sur *HBS1L-MYB*, il est possible de différencier nettement les patients selon l'âge de la première transfusion avec un modèle de Kaplan- Meier (Danjou et al. 2012).

La présente étude représente la première validation croisée du score TSS dans une population nord-africaine ou maghrébine. Malgré une origine génétique très différente pour les gènes modificateurs β-thal, ce système de notation discrimine également d'une façon pertinente les patients en ce qui concerne l'âge de la première transfusion, qui est clairement réduite pour les catégories de gravité élevée et très élevée.

Contrairement à Danjou et al. qui ne considéraient qu'un seul point final clinique, nous avons également testé le pouvoir discriminant du TSS pour de nombreux autres paramètres cliniques et biologiques (Danjou et al. 2015). Une tendance à une splénectomie précoce et à des taux de ferritinémie plus élevés a été observée chez les patients des catégories de TSS supérieures. Il serait intéressant de vérifier ces points dans d'autres cohortes multicentriques avec un plus large nombre de patients et avec un meilleur suivi médical.

Il est important aussi de tester la validité du score TSS lorsque les mutations β^+ thal sont beaucoup plus fréquentes que les mutations β°, comme dans le Sud-Est de l'Asie où les patients qui presentent un génotype Hb E/β-thal sont prédeminonts (Yang et al,. 2019).

Axe II : Caractérisation moléculaire des patients drépanocytaires

1. Caractéristiques épidémio et clinicobiologiques chez les patients drépanocytaires

La moyenne d'âge de diagnostic des patients drépanocytaires est 6,17+/-6,63ans. Pour la majorité des patients, à savoir 17 cas, soit 28,8%, l'âge du diagnostic est situé entre 0 et 2 ans. Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés par (Tebani, 2017) qui indique que l'âge moyen de son étude est de l'ordre de 8,33 ± 4,91 ans. Ces résultats sont proches de ceux de Nacoulma *et al.,* (2006) à Bobo qui rapportent un âge moyen de 8 ans. Tambo *et al.,* (2010) à Yaoundé et Yé Diarra *et al.,* (2008) à Ouagadougou rapportent des âges moyen inferieurs soit respectivement 7,2 ans et 7 ans. L'âge des patients drépanocytaires varient entre 15 et 70 ans avec une moyenne d'âge de 33,36+/-12,20 ans. La catégorie d'âge majoritaire des patients est celle entre 15 et 25ans. La tranche d'âge la plus représentée par (Tebani, 2017) est celle allant de 5 à 10 ans (90%). Nos résultats sont supérieurs à ceux de Nacoulma *et al.,* (2006) qui révèlent que la tranche d'âge des 5 à 10 ans est de 47%. Ceci pourrait s'expliquer par la répétition des syndromes vaso-occlusifs hyperalgiques après l'âge de 7 ans (Encyclopédie Orphanet Grand Public, 2011), par un dépistage tardif, des consultations tardives, et un début tardif des manifestations cliniques

On note une prédominance féminine avec un sexe ratio (M/F) de 0,475. Ces résultats sont similaires à Nacoulma *et al.,* en 2006 à Bobo ont retrouvé une prédominance féminine dans leur série (sex-ratio de 0,8). Par contre, Diagne *et al.,* (2000) ; Tambo *et al.,* **(**2010) ; Traoré *et al.,* **(**2002) ; Yé Diarra *et al.,* (2008), rapportent des résultats similaires avec un sex-ratio respectivement de 1,08, 1,2, 1,28 et 1,44. Thuilliez *et al.,* (1997) ; Gbadoé *et al.,* (2001), ont observé un sex-ratio de 1.

Les patients de notre étude issus d'un mariage consanguin représentent 44%, alors que les patients issus de mariage non consanguin représentent 66%. Les mêmes résultats sont observé par Tebani, 2017 où 47% des enfants de l'étude sont nés d'un mariage consanguin, ce qui est supérieur au résultat de l'étude de Diallo D *et al.,* (2009) portant sur 66 enfants drépanocytaires, où 32,8% sont issus d'un mariage consanguin, et inferieur à celui de Nehoulne, (2003) qui dans une étude portant sur 90 enfants drépanocytaires rapporte que 52% sont issus d'un tel mariage.

On note que le pourcentage d'avoir un frère malade dans notre étude et de l'ordre de 44%. Des résultats identiques sont retrouvés dans l'étude de Tebani, 2017 : 43,3% des cas ont au

moins, un frère drépanocytaire. Diallo *et al.*, 2009 et Eloundou , 2012, rapportent respectivement 31% et 35% des cas avec au moins un frère drépanocytaire.

Nos résultats montrent une prédominance de la catégorie de patients qui présente en moyenne une CVO par an. Ce qui n'est pas en accord du nombre moyen de crises dans l'année était de 5,35 survenant plus fréquemment chez les SS que chez les patients SC (3,68 fois en moyenne). Les crises ont une duré en moyenne de 4,96 jours chez les SC, elles durent plus longtemps chez les SS (6,14 jours). Les CVO sont accompagnées d'une insomnie dans 83,33% des cas et ont entrainé un absentéisme scolaire dans 45,80% des cas ce qui explique souvent le retard scolaire des enfants drépanocytaires (Tebbani, 2017).

On note la présence de 7 cas de sérologie HCV positive sur une population de 59 patients ce qui représente un pourcentage de 11.8% des patients. A Yaoundé, Sack et al, 2013 ont trouvé un pourcentage proche de 6,5% . cette étude a indiqué aussi une prévalence de 42,86% de positivité de l'Ac anti-HCV pour la population drépanocytaire ayant reçu plus de 10 transfusions contre 12,77% pour celle ayant reçu moins de 10 transfusions. Tous les personnes ayant fait une transfusion sanguine avant 1995 peuvent contracter la maladie vue l'absence de la sérologie systématique de tous les poches de sang (Ghany MG et al. 2009).

Une prédominance des homozygotes est remarquée par rapport aux hétérozygotes avec un pourcentage de 72.88% pour les homozygotes et de 27.12% pour les hétérozygotes. Au contraire, une prédominance chez les homozygotes (S/S) a été observé dans l'étude de Boukoftane et al, 2019 avec un pourcentage de 55.17%.

Dans notre étude, l'hémogramme était pratiqué de façon systématique pour les malades. L'anémie était retrouvée chez tous les patients, le taux d'hémoglobine variait entre 5,2 et 10,5 g/dl, rejoignant les études faites par Hakek et al. (2010). L'anémie est souvent accompagnée d'une hypochromie et constitue un signe biologique évocateur d'une hémoglobinopathie. Le profil éléctrophorétique a montré que la totalité des patients avaient une bande intense de l'hémoglobine S et une autre bande migrant en position A2 d'intensité variable.

Sur le plan biologique, les anomalies de l'hémogramme les plus rencontrées chez les thalassodrépanocytaires sont l'anémie sévère présente dans tous les cas, une microcytose dans 58 %et, une hypochromie dans 22,16 % des cas. Pour les enfants thalasso-drépanocytaires, le diagnostic a été porté devant un taux d'hémoglobine S supérieur à 40% excluant une drépanocytose, avec présence de l'hémoglobine A, éliminant ainsi la drépanocytose.

Dans l'électrophorèse de l'Hb réalisé pour les patients, le taux moyen de l'HbS des patients drépanocytaires est assez élevé et de l'ordre de 80.6 ± 19.9 %. Un résultat similaire été trouvé par la série de (Boukoftane et al, 2019), le taux moyen d'hémoglobine S était de 76,20%±8,31%, concordant ainsi avec les données de la littérature et des autres études antérieures (Dahmani et al., 2017; Oukheda, 2013; Doupa et al, 2017). Le taux moyen de l'HbF est très élevé (17,13%±9,25%), cela peut faire suspecter une hétérozygotie composite S/PHHF relationnelle. L'Hb A était absent chez tous les patients. Couque et De Montalembert (2013) ainsi que Oukheda et al. (2013) ont également rapporté une augmentation de d'Hb F avec une moyenne de 14,2 ± 0,5%. Le taux moyen de la ferritine est de l'ordre de 928.3 ng/mL. Ces résultats ne sont pas très loin de ceux retrouvé (Boukoftane et al, 2019) qui ont trouvé une moyenne de férritinémie égale à 423.25±25ng/mL.

2. Génotypage du gène beta globine chez les patients drépanocytaires

L'analyse moléculaire des patients drépanocytaires a permet la différenciation entre les patients homozygotes S/S et les patients hétérozygotes S/ β-thal. Le pourcentage de génotypes Hb S/β-thal chez les patients atteints de drépanocytose était très élevé dans notre étude (27,0 %) comparativement aux cohortes européennes ou ouest-africaines de drépanocytose où ces patients représentent moins de 5,0 % (Gueye et al. 2017, Renoux et al. 2017). Des proportions similaires de génotypes Hb S/β-thal ont été observées dans d'autres cohortes Maghreb : 25,0% en Tunisie (Ouali et al. 2016) et 16,7% au Maroc (Hafiani et al. 2017).

Cette surreprésentation du génotype S/β-thal en Afrique du Nord par rapport à l'Afrique noire peut refléter la prévalence plus élevée des alléles β-thal dans ces pays par rapport au gène HbS mais aussi un niveau plus élevé de consanguinité chez ces populations, particulièrement dans les régions rurales où la fréquence des mariages entre cousins de premier degré peut atteindre 25,0 à 30,0 % (Bener et al. 2019).

Cependant, des mutations de novo se produisent également comme le reflète la nouvelle mutation identifiée (HBB : c.374dup; p.Pro126thrfs_15). Il s'agit d'une mutation de décalage du cadre de lecture au niveau de l'exon 3 du géne β globine et on peut supposer que un ARNm tronqué seras le résultat de la traduction de la séquence muté et qui n'est pas dégradé par le mécanisme de dégradation des ARN non sens (NMD) (Forster et al. 2015), donnant ainsi naissance à une protéine très instable. Cela peut expliquer l'anémie microcytique et hypochromique régénérative sévéré observé chez le patient porteur de la

mutation. À l'exception de ce patient, tous les génotypes Hb S/b-thal de notre étude auraient été pu être identifié par le kit MED b-Globin Stripassay (Viennalab Diagnostics Gmbh).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les hémoglobinopathies comptent parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes dans le monde entier et l'Algérie est parmi les pays les plus touchés par ces désordres. Le plus grand problème rencontré pour ces pathologies est d'établir un diagnostic prénatale de la maladie et le dépistage des porteurs, pour une meilleure prise en charge des familles touchées, en leur proposant une thérapie adéquate le plus précocement possible et/ou un conseil génétique, en vue d'améliorer leurs qualité de vie et aussi de limiter la propagation de la maladie en évitant les mariages consanguins entre les porteurs hétérozygotes.

Notre étude a permis d'élaborer une caractérisation biologique et moléculaire des hémoglobinopathies dans la région nord-est de l'Algérie et Elle a confirmé les résultats des quelques études précédentes sur la prévalence élevée de l'hétérogénéité moléculaire des mutations β thalassémiques en Algérie. Le premier objectif était de déterminer les fréquences alléliques et le spectre des mutations β-thal chez les patients atteints d'une hémoglobinopathie (β-TM, β-TI et drépanocytose) dans trois provinces du nord-est de l'Algérie, à savoir Annaba, Guelma et Eltaref;

Les résultats du séquençage des mutations β-thal dans la population de l'étude montrent que deux défauts moléculaires particuliers représentant environ 70,0% de tous les allèles β-thal (quelle que soit la région d'origine), la méthode de génotypage employée doit au moins pouvoir les détecter de manière fiable. Une implémentation de techniques simples telles que la PCR-ARMS basé sur l'amorçage spécifique à l'allèle est primordiale dans la caractérisation des mutations β thalassémiques.

Un autre moyen simple et fiable pour les laboratoires sans accès au séquençage Sanger est l'utilisation du kit d'hybridation Stripassay MED (Viennalab Diagnostics Gmbh) qui permet le génotypage des 22 plus fréquents β- thal mutations dans le bassin méditerranéen qui va permettre aux cliniciens d' élaborer le diagnostic génétique de la majorité des cas vu l'absence du séquençage Sanger en Algérie.

Le deuxième objectif était d'évaluer si l'évolution clinique de la β-thalassémie dépendait ou non de la région d'origine. Nos résultats montrent qu'aucune différence statistique significative n'a été observée entre les trois wilayas dans la prise en charge des patients. Tous les patients recevaient des schémas thérapeutiques semblables et un suivi de la maladie identique et même l'évolution des patients est pareille.

Le troisième objectif était d'évaluer pour la première fois la validité du score TSS dans une population originaire du Maghreb et étudier la corrélation entre les caractéristiques clinico-biologiques des patients et la sévérité de la maladie. Considérant les difficultés rencontrées par les médecins pour la prise en charge correcte des patients β-TM (indisponibilité du traitement de chélation et sécurité transfusionnelle insuffisante), l'utilisation du TSS pour la prévision de la gravité peut être particulièrement importante pour adapter le régime transfusionnel et prévenir les complications lourdes de la surcharge en fer.

Enfin, les travaux prospectifs doivent inclure un effectif plus important de personnes atteintes et faisant appel à une combinaison de plusieurs techniques complémentaires pour le diagnostic phénotypique ainsi que la caractérisation moléculaire de ces pathologies héréditaires sont attendus. Cela permettra une meilleure connaissance des caractéristiques épidémiologiques et moléculaires des hémoglobinopathies dans notre contexte algérien, la compréhension de leur mécanisme d'expression et des corrélations génotype/phénotype, tout cela aidera à orienter efficacement la planification des actions de contrôle et de prévention de ces maladies. On recommande l'implémentation rapide des techniques simples de biologie moléculaire pouvant faire le diagnostic des hémoglobinopathies voire même initier le diagnostic prénatale en Algérie et ajouter l'électrophorèse de l'hémoglobine dans le bilan prénuptial des jeunes couples. Cela permettra une meilleure connaissance des caractéristiques épidémiologiques et moléculaires des hémoglobinopathies dans le contexte algérien, la compréhension de leur mécanisme d'expression et correlations phénotype/génotype, tout cela aidera à orienter efficacement la planification des actions du contrôle et de prévention de ces maladies.

Références Bibliographiques

Addour Boudrahem N. (2008). Caractérisation moléculaire des β-thalassémies dans la population algérienne : impact des mutations sur l'expression clinique. Thèse de doctorat. USTHB. 189pp.

Addour N B, Zidani N, Carion N, Labie D, Belhani M, Beldjord C. (2009). Molecular Heterogeneity of β-Thalassemia in Algeria: How to face up to a Major Health Problem. Hemoglobin. 1(33): 25.

Agarwal M B. (2009). Advances in management of thalassemia. Indian journal of pediatrics. 76, 177–184.

Aguilar-Martinez P, Catherine Badens, Nathalie Bonello-Palot *et al.* (2010). Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. Annales de Biologie Clinique. 68(4): 455-464.

Akhavan HN, Derakhshandeh PP, Banihashemi A, *et al.* (2011). A comprehensive molecular characterization of beta thalassemia in a highly heterogeneous *population. Blood Cells, Molecules , and Diseases* 47, 29 – 32.

Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, et al. (2011). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. Blood. 118(1): 19‑27.

Alain J, Marengo-Rowe. (2007). The thalassemias and related disorders. Baylor University Medical Center Proceedings. 20:1, 27-31.

Al-mosawy WF. (2017). The beta-thalassemia. Scientific Journal of Medical Research. 1(1): 24-30.

Al-Riyami, Arwa Z; Al-Mahrooqi, Sabah; Al-Hinai, Sumaiya; *et al.* (2014). Transfusion therapy and alloimmunization in Thalassemia Intermedia: A 10 year experience at a tertiary care university hospital. Transfusion and Apheresis Science. 51(1): 42 – 46.

Al-Sultan A, Phanasgaonkar S, Suliman A, Al-Baqushi M, Nasrullah Z, Al-Ali A. (2011). Spectrum of β-thalassemia mutation in the eastern province of Saudi Arabia. *Hemoglobin* , 35(2):125–134.

Al-Sweedan SA, Jaradat S, Iraqi M, Beshtawi M. (2009). The prevalence of factor V Leiden (G1691A), prothrombin G20210A and methylentetrahydrofolate reductase C677T mutations in Jordanian patients with beta-thalassemia major. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 20 (8): 675-678.

Amato, A., & Giordano, P. C. (2009). Screening and genetic diagnosis of hemoglobinopathies in southern and northern europe: two examples. Mediterranean journal of hematology and infectious diseases, 1(1), e2009007.

Antoniou M, deBoer E, Habets G, Grosveld F. (1988). The human β globin gene contains multiple regulatory regions: identification of one promoter and two downstream enhancers. Embo J, 7, 2, 377-384.

Aubry, P. and Gauzere, B.A. (2014). Hémoglobinoses: Actualités 2014, Médecine Tropicale. 14p.

Ayfer GP, Turgay D, Gokalp D, Bevazit N, Haspolat K, Soker M. (2011). Assessment of thyroid function in children aged 1-13 years with beta-thalassemia major. Iranian Journal of Pediatrics. 1(21): 77-82.

Barragan E, Bolufer P, Maria LP, Prieto F, Miguel. A. S. (2006). Molecular detection of Spanish δβ-thalassemia associated with β-thalassemia identified during prenatal diagnosis. *Clinica Chimica Acta 368.* 195 – 198.

Baudin B. (2016). Les hémoglobines normales et pathologiques. Revue Francophone Des Laboratoires. 481: 27-34.

Baysal E. (2001). Hemoglobinopathies in the United Arab Emirates. Hemoglobin. 25(2), 247-253.

Behringer RR, Hammer RE, Brinster RI, Palmiter RD, Townes TM. (1987). Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of human β-globin genes in transgenic mice. *Proc Nalt Acad Sci* USA, 84, 20: 7056-7060.

Belhadi K. (2011). Etude des hémoglobinopathies dans la population de la région de Batna. Mémoire de Magister en Biologie cellulaire et physiologie animale. Université El-Hadj-Lakhdar. 29-57.

Belhani M. (2009). Epidémiologie de la β-thalassémie homozygote en Algérie. Revue Algérienne d'hématologie. 1:22.9.

Bener A, Al-mulla M, Clarke A. (2019). Premarital screening and genetic counseling program: studies from an endogamous population. International Journal Applied Basic Medecine Research. 9(1):20–26.

Ben Maamar. (2009). Etude des hémoglobinopathies à CHU Mustapha Bacha d'Alger.in: Djeddi et Benameur. (2017). Depistage des hemoglobinopathies au chu tlemcen. Thèse de Doctorat en Pharmacie.universite Abou Bekr Belkaîd.96p.

Bennani C, Bouhass R, Perrin-Pecontal P, Tamouza R, Malou M, Elion J, Trabuchet G, Beldjord C, Benabadji M, Labie D. (1994). Anthropological approach to the heterogeneity of b-thalassemia mutations in northern Africa. Hum Biol. 66(3): 369–382.

Bennani C, Tamouza R, Rouabhi F, Benabadji M, Malou M, Elion J, Labie D, Beldjord C. (1993). The spectrum of β-thalassaemia in Algeria: possible origins of the molecular heterogeneity and a tentative diagnostic strategy. British Journal of Haematology. 84(2):335–337.

Benkirane Agoumi N. Sebar A. (2003). Les hémoglobinopathies au Maroc. Archives de pédiatrie. 10(7):654-655.

Bensimon Charmot D. (1999). Les gènes des globines humaines : que nous apprend leur polymorphisme?. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique (4) : 242-248.

Berg PE, Williams DM, Qian RL, Cohen RB, Cao SX, Mettelman M, Schechter AN. (1989). A common protein binds to tow silencers 5' to the human β-globin gene. *Nucleic Acids Res*, 17, 21: 8833-8852.

Bodine DM, Ley TJ. **(1987).** An enhancer element lies 3' to the human Aγ globin gene. Embo J, 6, 10: 2997-3004.

Bogard M, Lamoril J. (1998). Analyse quantitative des acides nucléiques. In : Biologie moléculaire en biologie clinique. *Méthodes. Collection Option Bio. Elsevier*: 119- 226.

Bonello-Palot N, Badens C. (2010). Bases moléculaires des syndromes thalassémiques et facteurs génétiques modulateurs de sévérité de la beta-thalassémie. Revue Méditerranéenne de Génétique Humaine. 1 : 1-10.

Bonello-palot N, Cerino P, Joly P, Badens C. (2016). Les thalassémies en 2016. Revue Francophone Des Laboratoires. 481: 67-75.

Bouchrit CH, Taoussi S, Lamraoui F, *et al.* (2017). Place de la corticothérapie dans l'alloimmunisation post transfusionnelle dans la β thalassemie homzygote, Congrés nationale d'hématologie.

Bouhass R, Perrin P, Trabuchet G. (1994). The spectrum of β-thalassemia mutations in the Oran region of Algeria. Hemoglobin. 18(3): 211–219.

Bourouba R, Houcher B, Djabi F, Egin Y, Akar N. (2009). The prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T, factor V 1691 G-A, and prothrombin 20210 G-A mutations in healthy populations in Setif, Algeria. Clnical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 15(5): 529-534.

Boussiou M, Karababa P, Sinopoulou K, *et al.* (2008). The molecular heterogen eity of β -thalassemia in Greece. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 40, 317 – 319.

Brumpt LC, Pays JF. ***(1988).*** *La* thalassémie béta zéro eurasiatique *et les* migrations mongoles. *Hist Sci Med. 22 :(1):65–74.*

Bunn HF. (1997). Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 337:762–9.

Cabeda JM, Correia C, Estevinho A, Simoes C, Amorim ML, Pinho L, Justic B. (1999). Unexpected pattern of b-globin mutations in β-thalassaemia patients from northern Portugal. *Br Jr of Haematology*, 105:68–74.

Cai SP, Kan YW. (1990). Identification of the Multiple ,B-Thalassemia Mutations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. J. Clin. Invest. Volume 85 : 550-553.

Cao A, Galanello R. (2010). Beta-thalassemia. Genetics in Medicine. 12 (2): 61-76.

Cao A, Gossens M, Pirastu M. (2008). β Thalassaemia mutations in Mediterranean populations. British Journal of Haematology. 71(3):309–312.

Cappellini MD, Cohen A, Porter J, Taher A, Viprakasit V. (2014).
Recommandations pour la prise en charge des thalassémies dépendantes des transfusions (TDT). Thalassemia International Federation. 16-17.

Chang YC, Smith KD, Moore RD, Serjeant GR, Dover GJ. (1995). An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. *Blood.* 85(4):1111-7.

Chang YP, Maier-Redelsperger MS, Mith KD, *et al.* (1997). The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. *Br J Haematol* , 96 : 806–14.

Chang, J. C, Lu R, Lin C, Xu S M, Kan Y. W, Porcu, S, Carlson, E, Kitamura M, Yang S, Flebbe-Rehwaldt L, & Gaensler K M. (1998). Transgenic knockout mice exclusively expressing human hemoglobin S after transfer of a 240-kb betas-globin yeast artificial chromosome: A mouse model of sickle cell anemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *95*(25), 14886–14890.

Chevet, E. (2015). Nouvelle piste thérapeutique dans la β-thalassémie. Thèse de doctorat en Pharmacie.UFR sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé, Université Angers. 178 pages.

Chong SS, Corinne D. Boehm, Douglas R. Higgs, Garry R. (2000). Cutting; Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α-thalassemia. *Blood.* 95 (1): 360–362.

Chouk I, Ben Daoud B, Mellouli F, Bejaoui M, Gerard N, Dellagi K, Abbes S. (2004). Contribution to the Description of the β–Thalassemia Spectrum in Tunisia and the Origin of Mutation Diversity. *Hemoglobin,* Vol. 28, No. 3, pp. 189–195.

Clark, BE, Shooter, C, Smith, F, Brawand, D, Thein, SL. (2017). Next-generation sequencing as a tool for breakpoint analysis in rearrangements of the globin gene clusters. Int J Lab Hem. 39(Suppl. 1): 111– 120.

Costello R. (2009). Actualités sur les thalassémies. La Revue de la Médecine Interne. 30: 22-23.

Couque N, De Montalembert M. (2013). Diagnostic d'une hémoglobinopathie. Feuillets de Biologie. 311: 5-18.

Couque N, Trawinski E, Elion J. (2016). Génétique des maladies de l'hémoglobine. Revue Francophones Des Laboratoires. 481 : 49-60.

Craig JE, Rochette J, Fisher CA, Weatherall DJ, Marc S, Lathrop GM, Demenais F, Thein S. (1996). Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. *Nat Genet*. 12(1):58-64.

Dahmani F., Benkirane S., Kouzih J., Woumki A., Mamad H et Masrar A. (2017). Profil épidémiologique des hémoglobinopathies: étude transversale descriptive autour du cas index. Pan AfricanMedical Journal 27:150p.

Danjou, F., Anni, F., Perseu, L., Satta, S., Dessì, C., Lai, M. E., Fortina, P., Devoto, M., & Galanello, R. (2012). Genetic modifiers of β-thalassemia and clinical severity as assessed by age at first transfusion. Haematologica, 97(7), 989–993.

Danjou F, Zvi Ioav Cabantchik, Raffaella Origa, et al. (2014). A decisional algorithm to start iron chelation in patients with beta thalassemia", *Haematologica*. Pavia, Italy, 99(3), pp. e38-e40.

Danjou, F., Francavilla, M., Anni, F., et al. (2015). A genetic score for the prediction of beta-thalassemia severity. Haematologica. *100*(4), 452–457.

Deborah R, Elizer R. (2005). Medical progress beta-thalassemia. The New England Journal of Medecine. 11 (353): 1135-1146.

De Franceschi L, Bachar D, Galacteros F, et al. (1997). Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with scickle cell disease. *J Clin Invest*, 100 (7): 1847-52.

Deisseroth A, Nienhuis A, Turner P, et al. (1977). Localisation of the human α-globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids. Cell, 12: 205-216.

Deisseroth, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., Giles, R., Turner, P. et Ruddle, F. H. (1978). Chromosomal localization of human β-globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc Nalt Acad Sci* U S A, 75: 1456-1460.

Desrosiers P. (2003). La thalassémies mineure. Le Médecin du Québec. 10 (38): 59.

Dimitrios T, Kremastinos MD. (2001). Heart failure in β-Thalassemia. Congestive Heart Failure. 6 (7): 312-314.

Di Marco V, Marcello Capra, Emanuele Angelucci, et al, on behalf of the Italian Society for the Study of Thalassemia and Haemoglobinopathies and Italian Association for the Study of the Liver. (2010). Management of chronic viral hepatitis in patients with thalassemia: recommendations from an international panel. *Blood*. 116 (16): 2875–2883.

Dhondt JL, Farriaux JP. (2000). La fabuleuse histoire du dépistage néonatal. *Ann. Bio Clin.* 58: 267-276.

Djemaa I. (2013). Mise au point de la DGGE en vue du diagnostic de la bêta thalassémie et de la drépanocytose. Mémoire de Magister en génétique moléculaire des populations humaines. Université de Tlemcen. 88 pages.

Djenouni A, Grifi F, Bahlouli M. (2002). Prise en charge des thalassémies majeures au CHU Annaba allant de 1995 à 2002. Thèse de doctorat en médecine. 86p.

Dogaru M, Talmaci R, Coriu D, Badelita S. (2011). Sensitivity, specificity and efficiency of different discriminative indexes in differentiation of thalassemia trait from iron deficiency anemia. Biointerface Research in Applied Chemistry. 1 (1): 2-8.

Doupa D., Djite M., Gueye P.M., Seck M., Faye B.F., Seck M et al. (2017). Profil biochimique et hématologique des patients drépanocytaires homozygotes en phase stationnaire au centre National de Transfusion Sanguine de Dakar. Int. J. Biol. Chem. Sci. 11(4): 1706-1715

Ebrahimi, M., Mohammadi-asl, J. & Rahim, F. (2020). Molecular spectrum and distribution of hemoglobinopathies in southwest of Iran: a seven-year retrospective study. *J Hematopathol* **13,** 97–103.

Efremov GD; 1973; Dominantly Inherited beta-Thalassaemia. *Hemoglobin.* x 31(2):193-207.

Efremov DG, Dimovski AJ, Efremov GD; 1991 Detection of betathalassemia mutations by ASO hybridization of PCR amplified DNA with digoxigenin ddUTP labeled oligonucleotides. *Hemoglobin ;* 15 : 325-533.

Eliezer AR, Giardina PJ. (2011). How I treat thalassemia. Blood Journal of Hematology.13 (118): 3479-3488.

El-Kamah G, Amr S K. (2015). Thalassemia- From Genotype to Phenotype. Inherited Hemoglobin Disorders. Anjana Munshi. pp 13-33.

El-Gawhary S, El-Shafie S, Niazi M, Aziz M, El-Beshlawy A. (2007). Study of β-thalassemia mutation using the polymerase chain reaction- amplification refractory mutation system and direct DNA sequencing techniques in a group of Egyptian thalassemia patients. *Hemoglobin, 31* (1):63–69.

Elion J, Berg PE, Lapoumeroulie C, Trabuchet G, Mittel-man M, Krishnamoorthy R, et al; (1992). DNA sequence variation in a negative control region 5'to the β globin gene correlates with the phenotypic expression of the βS mutation. *Blood*, 79:787–92.

El-Latif M, Filon D, Rund D, Oppenheim A, Kanaan M. (2002). The β+- IVS-6 (T→C) mutation accounts for half of the thalassemia chromoses in the Palestinian populations of the mountain regions. *Hemoglobin,* 26(1), 33-40.

Fabry M E, Costantini F et al. (1992). High expression of human beta S- an alpha-globins in transgenic mice: erythrocyte abnormalities, organ damage, and the effect of hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA. 89(24): 12155-9.

Fabry, M. E., S. M. Suzuka, et al. (2001). Second generation knockout sickle mice: the effect of HbF. Blood 97(2): 410-8.

Fattoum S, Messaoud T, Bibi A. (2004). Molecular basis of β-thalassemia in the population of Tunisia. Hemoglobin. 28(3):177–187.

Fernandez E, Bienvenu T, Desclaux F, Beldjord C. (1993). Use of chemical clamps in denaturing gradient gel electrophoresis : application in the detection of the most frequent mediterranean beta thalassemic mutations. *PCR : methods and applications* : 122-4

Figen Guzelgul, G. Seyda Seydel & Kiymet Aksoy. (2020). β-Globin Gene Mutations in Pediatric Patients with β-Thalassemia in the Region of Çukurova, Turkey, Hemoglobin, DOI: 10.1080/03630269.2020.1792489

Fisher SG, Lerman LS. (1983). DNA differing by a single base-pair substitution are separated in denaturing gradient gels. Correspondance with melting theory. *Pro Acad*

Sci USA: 80 1579-1783.

Flintt J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. (1998). The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol* , 11:1–51.

Forster L, Ardakani RM, Qadah T, et al. (2015). The effect of nonsense mediated decay on transcriptional activity within the novel b-thalassemia mutation HBB: c.129delT. Hemoglobin. 39(5):334–339.

Francesca Rossi, Silverio Perrotta, Giulia Bellini, et al. (2014). Iron overload causes osteoporosis in thalassemia major patients through interaction with transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels, *Haematologica*. Pavia, Italy, 99(12), pp. 1876-1884.

Fritsh EF, Lawn RM, Maniatis T; 1980, Molecular cloning and characterization of the human β globine gene cluster. *Cell*, 19: 959-972.

Galanello R, Origa R. (2010). Beta-thalassemia. Orphanet Journal of Rare Diseases. 5: 1-15.

Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G. (2010). Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. Nat Genet; 42(12):1049‑51.

Ghesquieres H. (2010). Etude des polymorphismes génétiques des gènes des cytokines dans les lymphomes hodgkiniens. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire. Université Claude Bernard Lyon 1. pp 11-13.

Gilman JG, Huisman TH. (1995). DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. Blood; 66(4):783‑7.

Giordano P C. (2013). Strategies for basic laboratory diagnostics of the hémoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. International Journal of Laboratory Hematology. 35: 465-479.

Girot R, De Montalembert M. (2006). Thalassémies chez l’enfant. EMC-Pédiatrie-Maladies infectieuses. (6): 1-3.

Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. (1998). Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate redyctase (MTHFR). Mammalian Genome. 8 (9): 652-656.

Greene D, Vaugn C, Crews B, Agarwal A. (2015). Advances in detection of hémoglobinopathies. Clinica Chimica Acta. 439: 50-57.

Grifi F, Djenouni A, Bougherira S, Abad MT, Boucherit C, Boudjira N, et al. (2017). La β thalassémie en Algérie : Etude nationale multicentrique. Congrés de la Société Algérienne d'Hématologie et de Transfusion Sanguine. 26-28 Octobre 2017. Constantine.

Grosveld, F., G. B. Van Assendelft, et al. (1987). Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. Cell 51(6): 975-85.

Gueye Tall F, Martin C, Malick Ndour EH, et al. (2017). Genetic background of the sickle cell disease pediatric population of Dakar, Senegal, and characterization of a novel frameshift b-thalassemia mutation [HBB: c.265_266del; p.Leu89Glufs_2]. Hemoglobin. 41(2):89–95.

Gueye Tall F, Cyril Martin, El Hadji Malick Ndour, et al. (2017). Genetic Background of the Sickle Cell Disease Pediatric Population of Dakar, Senegal, and Characterization of a Novel Frameshift **β**-Thalassemia Mutation [*HBB*: c.265_266del; p.Leu89Glufs*2], Hemoglobin, 41:2, 89-95.

Haddad N, Bradai M. (2016). Epidémiologie de la béta thalassémie hétérozygote, dans le CHU de Blida: Implications, pour le dépistage de la population. Santé-Mag. 53 : 10-13.

Hafiani K, Bazoui H, EL Mahdi Y, et al. (2017). Major sickle cell syndromes in children in Kenitra, Morocco. Asian Pac J Trop Dis. 7(11):688–690.

Han AP, Flemnig MD, Chen JJ. (2005). Heme-regulated eIF2α kinase modifies the phenotypic severity of murine models of erythropoietic protoporphyria and β-thalassemia. The Journal of Clinical Investigation. 115 (6): 1562-1570.

Hardison RC. (2012). Evolution of Hemoglobin and Its Genes. Cold Spring Harpor Perspectives in Medicine: 1-18.

Horn F, LindenneheR G, Grilhosl C, Moc I, Berghold S, Schneider N, Munster B. (2005). Biochimie Humaine. Medecine Science Flammarion. pp 484.

Iolascon A, Giordano P, Storelli AS, Li HH, Coppola B, Piga A, Fantola E, Forni G, Cianciulli P, Perrotta S, Magnano C, Maggio A, Mangiagli A, Devotob M. (2001). Thrombophilia in thalassemia major patients: analysis of genetic predisposing factors. Haematologica. 86 (10): 1112-1113.

Jaballah M.A, M.Mallek, C.Sehli, et al. (2019). Spectre des mutations bêta-thalassémiques majeures dans une population tunisienne. Journées de l'innovation en Biologie. 21 et 22 novembre 2019. Palais des congrès de Paris.

Jerbi Z, Abdennebi M, Douik H, Romdhane Hb, Harzallah L, Guemira F, Ghanem A. (2005). Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. Annales de Biologie Clinique. 63 (5) : 487-491.

Joly P, Lacan P, Garcia C, Meley R, Pondarre C, Francina A. (2011). A novel deletion/insertion caused by a replication error in the beta-globin gene locus control region. Hemoglobin. 35: 316-322.

Joly P, Lacan P, Garcia C, Delasaux A, Francina A. (2011). Rapid and reliable b-globin gene cluster haplotyping of sickle cell disease patients by FRET Light Cycler and HRM assays. Clin Chim Acta. 412(13- 14):1257–1261.

Joly P, Pondarre C, Badnes C. (2014). Les beta-thalassémies: aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques. Annales de Biologie Clinique.72 (6) : 641- 664.

Jouini L, Sahli CA, Laaouini N, et al. (2013). Association between clinical expression and molecular heterogeneity in β-thalassemia Tunisian patients. Mol Biol Rep. 40(11):6205–6212.

Kaplan JC, Delpech M. (2007). Biologie Moléculaire et Médecine. Flammarion. pp 87-88.

Katsumura KR, Devilbiss AW, Pope NJ, Johnson KD, Bresnick EH. (2013). Transcriptional Mechanisms Underlying Hemoglobin Synthesis. Cold Spring Harbor Perspectives Medicine. 3: 1-19.

Keivan Moradi, Mozaffar Aznab, Susan Tahmasebi, Leila Omidniakan, Nushin Bijari & Reza Alibakhshi. (2020). Distribution of *HBB* Gene Mutations in the Kurdish Population of Ilam Province, West Iran, Hemoglobin, DOI: 10.1080/03630269.2020.1797772.

Khelil AH, S. Laradi, S. Ferchichi, N. Carion, M. Béjaoui, A. Saad, A. Chaieb, A. Miled, J. Ben Chibani, P. Perrin. (2003). Stratégie diagnostique des mutations beta-thalassémiques dans une famille tunisienne, application au diagnostic prénatal. Annales de Biologie Clinique. 61(2):229-33.

Klein Harvey G, Spahn Donat R, Carson Jeffrey L. (2007). Red blood cell transfusion in clinical practice. Lancet. 370(9585): 415-26.

Kurtoglu A, Karakus V, Erkal O, et al. (2017). β-Thalassemia gene mutations in Antalya, Turkey: results from a single centre study. Hemoglobin. 40(6):392–395.

Labie D, Bennani C, Beldjord C. (1990). β-Thalassemia in Algeria. Ann NY Acad Sci. 612:43–54.

Labie D, Benabadji M, Elion J. (1995). Genetic disorders in North African populations of the Maghreb: Morocco, Algeria and Tunisia. In: Teebi AS, Farag TI, Editors. Genetic Disorders Among Arab Populations. New York (NY, USA): Oxford University Press. 290–321.

Labie D, Elion J. (2005). Molecular and pathophysiological bases of haemoglobin diseases. EMC-Hématologie. 2: 220-239.

Labie D. (2009). L'expression de l'hémoglobine foetale est sous le contrôle du répresseur *BCL11A*. médecine/sciences; 25(5):457‑60.

Labie D. (2010). Les mécanismes de régulation de l'hémoglobine foetale. Hématologie;16(3):235‑43.

Lahlou S. (2016). Profil épidémio-clinique, biologique, thérapeutique et évolutif de la thalassémie chez l'enfant. Thèse de doctorat en médecine. Université de Sidi Mohammed Ben Abdellah. pp 80-82.

Lai Y, Chen Y, Chen B, Zheng H, Yi S, Li G, et al. (2016). Genetic Variants at BCL11A and HBS1L-MYB loci Influence Hb F Levels in Chinese Zhuang β-Thalassemia Intermedia Patients. Hemoglobin; 40(6):405‑10.

Laghmami R. (2018). Les thalassémies en région de Marrakech, Haouz etSud du Maroc. Thèse de doctorat en médecine. Faculté de Médecine et de Pharmacie Merrakech. 278 pages.

Lam EPT, Chan CML, Tsui NBY, Au TCC, So CC, et al. (2013). Clinical Applications of Molecular Technologies in Hematology. J Med Diagn Meth 2 : 130.

Leclerc D, Rozen R. (2007). Génétique Moléculaire de *MTHFR* Les polymorphismes ne sont pas tous bénins. Médecine Science. 3 (23) : 297-302.

Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araújo AS, Uda M, Sanna S, et al. (2008). DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. Proc Natl Acad Sci U S A; 105(33):11869‑74.

Lewin B. (2004). GENES VIII. Upper Saddle River, NJ : Pearson Prentice Hall. 1056pages.

Li B, Han X, Ma J, *et al.* (2020). Mutation spectrum and erythrocyte indices characterisation of α-thalassaemia and β-thalassaemia in Sichuan women in China: a thalassaemia screening survey of 42 155 women. *Journal of Clinical Pathology.* Published Online First: 27 July 2020.

Littee K. (2016). Analyse descriptive de quatre patients beta-thalassémiques majeures avec un diagnostic neonatal : apport de la greffe de moelle osseuse allogénique intrafamiliale. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Bordeaux .134pages.

Lodish HF. (1976). Translational control of protein synthesis. Annual Review of Biochemistry (45): 39-72.

Loutfi A, Jache S, El Hioui M, Khattab M, Ahami OT. (2015). Profil hématologique et nutritionnel chez les malades béta thalassémies majeur (BTM) au service d'hématologie et d'oncologie pédiatrique SHOP Hôpital d'enfant de Rabat, Maroc. International Journal of Innovation and Scientific Research. 2 (23) : 268-273.

Lucarelli G, Isgro A, Sodani P, Gaziev J. (2012). Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Thalassemia and Sickle Cell Anemia. Management of the Thalassemias. Cold Spring Harbor Perspectives in Medecine. 2-3.

Mahajan, M.C., Karmakar, S. and Weissman, S.M. (2007). Control of beta globin genes. J. Cell. Biochem., 102: 801-810.

Mandi S, Horvat V, Marczi K, Lukic I, Galic J. (2014). Association Study of Cytochrome P450 1A1*2A Polymorphism with Prostate Cancer Risk and Aggressiveness in Croatians. Collegium Antropol. 38 (5): 141-146.

Manning L, Russell E, Padovan J, Chait B, Popowicz A, Manning R, Manning J. (2007). Human embryonic, fetal and adult hemoglobin's have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. Protein Science (16): 1641-1658.

Manoj J, Abhay SB, Ashok P. (2013). Psychological problems in thalassemic adolescents and young adults. Chronicles of Young Scientists. 1(4): 21-23.

Marini Mg, Asunis I, Porcu L, Salgo MgG, Loi MG, Brucchietti A, Cao A, Moi P. (2004). The distal beta-globin CACCC box is required for maximal stimulation of the beta-globin gene by EKLF. British Journal Of Haematology. 127 (1): 114-117.

Martin H. Steinberg, Bernard G. Forget, Douglas R. Higgs, David J. Weatherall. (2009). Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, 2nd Edition. Cambridge University Press. Cambridge . 884p.

Mario N, Sala N. (2016). Diagnostic biologique des hémoglobinopathies. Revue Francophone des Laboratoires. 481 : 35-47.

Mekouar, H., Debecker, C., Mullier, F. ***et al.*** **(2009).** La PCR-temps réel dans le diagnostic des alpha-thalassémies: une alternative d'avenir ?. *Bio trib. mag.* **32,** 21–24.

Meng FD, Ma P, Sui CG, Tian X, Jiang YH. (2015). Association between cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene polymorphisms and the risk of renal cell carcinoma: a metaanalysis. Scientific Reports. 1.

Mesbah-Amroun Hamida, Fatiha Rouabhi, Rolande Ducrocq & Jacques Elion. (2008). Molecular Basis of α-Thalassemia in Algeria, Hemoglobin, 32:3, 273-278.

Merabet N. (2012). Association des polymorphismes génétiques du cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1) et risque du cancer du sein. Thèse de magistère en Biologie Animale. Université Hadj Lakhdar Batna. pp 28-33.

Murray Bender, Botham Kennelly, Rodwell Weil. (2010). Biochimie de Harper. De Boeck Université. pp 45.

Mustafa Ny, Marouf R, Al-Humood S, Al-Fadhli Sm, Mojiminivi O. (2010). Hypercoagulable state and methylenehydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation in patients with beta-thalassemia major in Kuwait. Acta Haematologica. 123: 37-42.

Nagel Ronald L. (2010). Hemoglobin Disorders Molecular Methods and Protocols. In Methods in Molecular Medicine.Vol 82.Humana Press, Totowa NJ. 289pages.

Noetzli LJ, Mittelman SD,Watanabe RM, Coates TD, Wood JC. (2012). Pancreatic iron and glucose dysregulation in thalassemia major. American Journal of Hematology. 87: 155-160.

Olivieri NF, Weatherall DJ. (2009). Clinical aspects of beta-thalassemia andrelated disorders. In : Steinberg MH, Forget BG, Higgs D, WeatherallDJ, eds.Disorders of hemoglobin genetics, pathophysiology and clinicalmanagement, Second ed. New-York : Cambridge University Press, p. 357-416.

Olivieri NF, Brittenham GM. (2013). Management of the Thalassemias. Cold Spring Harbor Perspectives in Medecine. 3:1-11.

Omar A, Abdel Karim E, Gendy WE, Marzouk I, Wagdy M. (2005). Molecular basis of beta-thalassemia in Alexandria. The Egyptian Journal of Immunology. 12(1):15-24.

Ouali, F., Siala, H., Bibi, A., Hadj Fredj, S., Dakhlaoui, B., Othmani, R., Ouenniche, F., Zouari, F., Bouguerra, B., Rezigua, H., Fattoum, S. and Messaoud, T. (2016). Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Tunisia: an 18 years of experience. Int. Jnl. Lab. Hem., 38: 223-232.

OU-KHEDA N. (2013). Les hémoglobinopathies : contribution du laboratoire de biochimie et de toxicologie de l'HMIMV à l'étude épidémiologique, clinique et biologique des cas répertoriés sur une période de 12 années. Thèse Doctorat Médecine, Rabat. n°13, 113 p.

Pandey S, Tripathi A, Tripathi J, Dubey S. (2016). CYP1A1 gene polymorphism among central Indian population and its genetic distribution. International Journal of Scientific Reports. 2 (1): 13-17.

Paraskevaidis A, Drakoulis N, Roots I, Orfanos CE, Zouboulis CC. (1998). Polymorphisms in the Human Cytochrome P-450 1A1 Gene (CYP1A1) as a Factor for Developing Acne. Dermatology. 196: 171-175.

Patrinos, G. P., Giardine, B., Riemer, C., Miller, W., Chui, D. H., Anagnou, N. P., Wajcman, H., & Hardison, R. C. (2004). Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. *Nucleic acids research*, *32* (Database issue), D537–D541.

Périchon B, Ragusa A, L apouméroulie C, Romand A, Moi P, Ikuta T, et al. (1993). Inter-ethnic polymorphism of the b-globin gene locus control region (LCR) in sicklecell anemia patients. *Hum Genet*, 91: 464–8.

Perrimond H. (2001). B-thalassémie- manifestations cliniques. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 94 (2): 92-94.

Perrin P, Bouhassa R, Mselli L, et al. (1998). Diversity of sequence haplotypes associated with b-thalassaemia mutations in Algeria: implications for their origin. Gene. 213(1-2):169–177.

Peter, B. (2003). Stathopulos. Taking the good out of the bad: lentiviral-based gene therapy of the hemoglobinopathies. *Biotechnology Advances 21.* 513 – 526.

Petros Kountouris, Kyriaki Michailidou, Soteroula Christou, et al. (2020). Effect of HBB genotype on survival in a cohort of transfusion-dependent thalassemia patients in Cyprus. *Haematologica*. Pavia, Italy. doi: 10.3324/haematol.2020.260224.

Picaut C. (2006). Contribution a l'étude statistique de la formule leucocytaire manuelle chez le chien : effet frottis et effet observateur. Thése de doctorat de vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. 191pages.

Pissard S, Raclin V, Lacan P, Garcia C, Aguilar-Martinez P, Francina A, Joly P. (2013). Characterization of three new deletions in the β-globin gene cluster during a screening survey in two French urban areas. Clinia Chimica Acta. 415: 35-40.

Purucker M, Bodine D, Lin H, McDonagh K, Nienhuis AW. (1990). Structure and function of the enhancer 3' to the Human Aγ globin gene. *Nucleic Acids Res*, 18, 24: 7407-7415.

Raich N, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Enver T. (1992). Demonstration of a human ε globin gene silencer with studies in transgenic mice. *Blood*, 79, 4: 861- 864.

Ramachandran VS, Edison ES, Poonkuzhali B, Srivastava A, Chandy M. (2003). Rapid Detection of β globin gene mutations and polymorphisms by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Clinical Chemistry* 49:5, 777–781.

Rahimi Z, Ghaderi M, Nagel Rl, Muniz A. (2008). Prevalence of thrombotic risk factors among beta-thalassemia patients from Western Iran. Journal of Thrombosis and Thrombolysis. 26 (3) : 229-233.

Renoux, C, Connes, P, Nader, E, *et al.* (2017). Alpha-thalassaemia promotes frequent vaso-occlusive crises in children with sickle cell anaemia through haemorheological changes. *Pediatr Blood Cancer*. 64:e26455.

Ribeil JA, Arlet JB, Dussiot M, Moura IC, Courtois G, Hermine O. (2013). Ineffective Erythropoiesis in β-Thalassemia. The Scientific World Journal. 394295.

Redding- Lallinger R, Knoll C. (2006). Sickle cell disease-pathophysiology and treatment. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 36 (10): 346-76.

Robien K, Ulrich CM. (2003). 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk: A Huge Minireview. Amerian Journal of Epidemiology. 7(157): 572.

Robet Girot, Pierre Bégué, Frédéric Galacteros. (2003). La drépanocytose. Edition; *John Libbey, Eurotext, Paris*, p:1.

Romdhane H, Amra H, Abdelkefi S, et al. (2014). Profil clinic-biologique et immunohématologique des patients atteints de beta thalassémies en Tunisie: à propos de 26 cas. Transfusion clinique et pathologique. 6 (21) : 309-313.

Rund D, Rachmilewitz E. (2005). Beta-thalassemia. The New England Journal of Medicine. 353: 1135-1146.

Sack, F. N., Noah Noah, D., Zouhaïratou, H., & Mbanya, D. (2013). Portage de l'antigène HBs et des anticorps anti-VHC chez le drépanocytaire homozygote à l'Hôpital Central de Yaoundé [Prevalence of HBsAg and anti-HCV antibodies in homozygous sickle cell patients at Yaounde Central Hospital]. *The Pan African medical journal*, *14*, 40.

Sadelain M, Rivella S, Lisowski L, Samakoglu S, Riviere I. (2004). Globin gene transfer for treatment of the beta-thalassemias and sickle cell diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* , 17 (3): 517-34.

Said F, Abdel-Salam A. (2015). XmnI polymorphism: relation to b-thalassemia phenotype and genotype in Egyptian children. Egypt J Med Hum Genet. 16(2):123–127.

Sall A, Toure AO, Sene A, Diatta A, Cisse F, Seck M, Faye B, Diop S. (2014). Approche diagnostique par le phénotype de la beta-thalassémie hétérozygote à Dakar. CAMES SANTE. 1(2): 41-44.

Sandhya RP, Vijayakumar S, Kumar VG, Chandana N. (2013). β-Thalassemia- Mini Review. International Journal of Pharmacology Research. 2(3): 71-79.

Sankaran VG, Xu J, Byron R, et al. (2011). A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. The New England Journal of Medicine. 365: 807-814.

Sayed Samira Z, Aly Basma A, Abd El-Hakim A Abd El-Hakim, Suzan M Omar, Amr S Amin. (2013). The early cardiac involvement in patients with β-thalassemia major. The Egyptian Heart Journal. 65(3): 243-249.

Schechter AN. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Blood (112): 3927-3938.

Shih HC, Er TK, Tien-Jye C , Ya-Sian C, Liu TC , Gowth JC. (2009). Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis. *Clinical Biochemistry,* 42; 1667 – 1676.

Sedat Yılmaz. (2019). The Spectrum of β-Thalassemia Mutations in Siirt Province, Southeastern Turkey, Hemoglobin, 43:3, 174-181.

Sigler B Paul. (1981). The Molecular Basis of Mutant Hemoglobin Dysfunction. Elsevier Science Ltd. New York. 320p.

Siguret V, J.-P. Andreux. (1997). Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. Annales de Biologie Clinique. 55(2):103-12.

Soliman Othman E, Sohier Yahia, Amany Shouma, et al. (2010) Reverse hybridization StripAssay detection of *β*-thalassemia mutations in northeast Egypt, Hematology, 15:3, 182-186.

Somervaille T. (2001). Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Journal of the Royal Society of Medicine, 94(11), 602–603.

Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, et al. (2014). HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. J Clin Invest; 124(4):1699‑710.

Stamatoyannopoulos G. (2000). Molecular and cellular basis of hemoglobin s witching. In: Steinberg ML, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. Disorders of hemoglobins, genetics, pathophysiology, and clinical management. New York: Cambrige University Press; p. 131–45.

Steiger A. (2012). Paramètres hématologiques de la béta-thalassémie. Point de vue Hématologie : 1-2.

Steiger A. (2015). Hémoglobinopathies. Point de vue Hématologie : 1.

Steinberg MH; 2006, Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci,* 27 (4): 204-10.

Stuart MJ, Nagel RL. (2004). Sickle-cell disease. *Lancet,* 364 : 1343–60.

Sutcharitchan P, Saiki R, Huisman THJ, Kutlar A. (1995). Reverse dot-blot detection of the Africain-American beta thalassemia mutations. *Blood* ; 4 : 1580-5.

Sylvie Langlois , Jason C. Ford, David Chitayat. (2008). Dépistage des porteurs de thalassémie et d'hémoglobinopathies au Canada. *Comité de diagnostic prénatal du collège Canadien des généticiens médicaux.*

Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Őzcelik H, Őzer A, Baig M, Senga EB, Başak AN. (1998). Molecular and population genetic analyses of β-thalassemia in Turkey. *Am J Hemat;* 57,3:215-220.

Tadmouri A, Basak N, Ghazi O. (2001). β-thalassemia in Turkey: a review of the clinical, epidemiologie, molecular, and evolutionary aspects. *Hemoglobin.* 25(2), 227-239.

Taher A, Isma'eel H, Mehio G, Bignamini D, Kattamis A, Rachmilewitz EA, Cappellini MD. (2006). Prevalence of thromboembolic events among 8,860 patients with thalassaemia major and intermedia in the Mediterranean area and Iran. Thromb Haemost. 96:488–491.

Taher A, Ismaeel H, Cappellini MD. (2006). Thalassaemia Intermedia: Revisited. Blood Cells Mol Dis. 37:12–20.

Taher AT, Otrock ZK, Uthman I, Cappellini MD. (2008). Thalassemia and hypercoagulability. Blood Rev. 22:283–292.

Taher, A., El Rassi, F., Ismaeel, H. and Inati, A. (2008). Complications of β-thalassemia intermedia: A 12-year Lebanese experience. Am. J. Hematol., 83: 605-606.

Taher A, Shammaa D, Bazarbachi A, Itani D, Zaatari G, Greige L, Otrock ZK, Mahfouz RA. (2009). Absence of JAK2 V617F mutation in thalassemia intermedia patients. Mol Biol Rep. 36:1555–1557.

Taher A, Vichinsky E, Musallam K, Cappellini MD, Viprakasit V. (2013). Guidelines for the management of non-transfusion dependent Thalassemia (NTDT). Thalassemia International Federation. 1st édition. 117pages.

Telen MJ. (2007). Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 84-90.

Tensaout F. (2017). Allogreffe des cellules souches hématopoïétiques dans la β-thalassémie majeure. Thèse de doctorat en science médicales. Université d'Alger. pp 4-12.

Terwilliger, N. B. (1998). Functional adaptations of oxygen-transport proteins. J Exp Biol . 201(8): 1085-98.

Thein SL. (2005). Genetic modifiers of β-thalassemia. Haematologica. 90 (5): 649-660.

Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. (2007). Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. Proc Natl Acad Sci U S A; 104(27):11346‑51.

Thein SL. (2017). Genetic basis and genetic modifiers of b-thalassemia and sickle cell disease. Adv Exp Med Biol. 1013:27–57.

Thuert I. (2014). Prise en charge des béta-thalassémies. La revue du praticien. (64) : 1132-1137.

Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, et al. (2008). Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. Proc Natl Acad Sci USA; 105(5):1620‑5.

Vichinsky EP. (2005). Changing patterns of thalassemia worldwide. *Ann N Y Acad Sci.* 1054:18-24.

Vinatier I. (2006). Recommandations pour la mise en oeuvre et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine. Laboratoire CERBA. 10.

Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Chinchang W, Sangkla P, Weiss MJ, Higgs DR. (2004). Evaluation of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) as a genetic modifier in patients with beta thalassaemia. *Blood.* 103(9):3296-9.

Vrettou C, Traeger JS, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E. (2003). Rapid Screening of Multiple β-Globin Gene Mutations by Real-Time PCR on the LightCycler: Application to Carrier Screening and Prenatal Diagnosis of Thalassemia Syndromes. *Clinical Chemistry 49:5* 769 –776.

Wahed A, Dasgupta A.(2015). Hematology and coagulation. Elsevier. pp 55-61.

Wajcman H. (2013). Hémoglobines : structure et fonction. EMC Hématologie (13): 1-11.

Wajcman H, Lantz B, Girot R; 1992. Les maladies du globule rouge. ISERM/ Médecine-Science Flammarion, Paris.

Wall L, deBoer E, Grosveld F; 1988, The human β-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid specific protein. Genes Dev.2, 9: 1089-1100.

Weatherall DJ. (2001). Phenotype-genotype relationships in mono-genic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet*. 2:245–55.

Weatherall DJ, Clegg JB. (2001). The thalassaemia syndromes. Oxford: *Blackwell Science; 4th edition. 846pages.*

Winslow C. (1978). Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities. Elsevier Science. New York. 705p.

Whipple GH, Bradford WL. (1933). Mediterranean disease-thalassemia (erythroblastic anemia of Cooley); associated pigment abnormalities simulating hemochromatosis. *J Pediatr*, 9:279–311.

Wonkam A, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Cooper RS, Tayo B, et al. (2014). Association of variants at BCL11A and HBS1L-MYB with hemoglobin F and hospitalization rates among sickle cell patients in Cameroon. PloS One; 9(3):e92506.

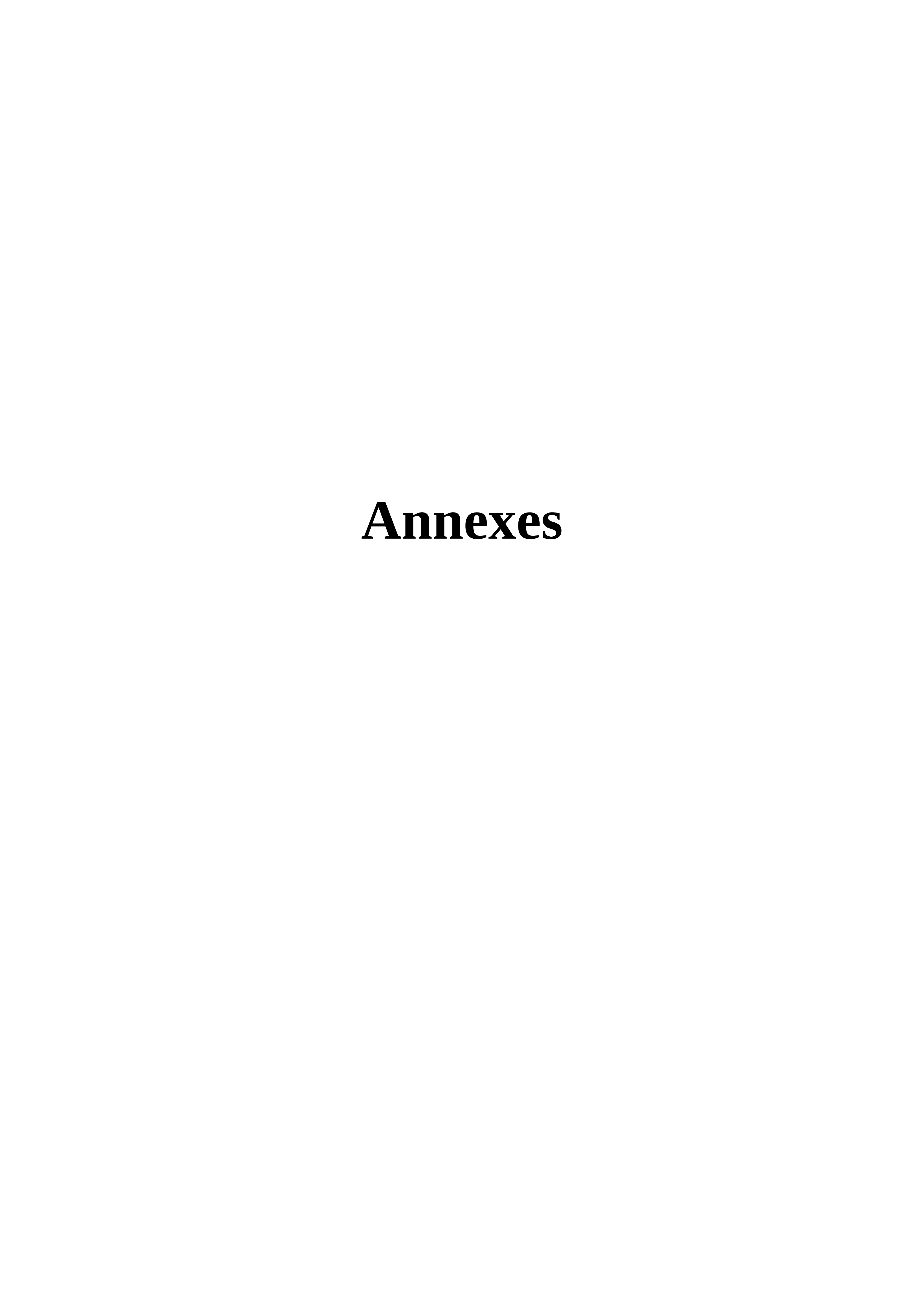
Wood WG. (2001). Hereditary persistence of fetal hemoglobin and δβ thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. *Disorders of hemoglobin.* Cambridge: Cambridge University Press; p. 356–88.

Yameogo P. (2009). Contribution à l'étude des paramètres hématologiques chez les femmes enceintes atteintes d'une Alpha thalassémie au centre médical SAINT CAMILLE DE OUAGADOUGOU. Mémoire de l'école doctorale régionale du RABiotech en Biotechnologie Microbienne et Cellulaire. pp10-11.

Yang, Z., Cui, Q., Zhou, W., Qiu, L., & Han, B. (2019). Comparison of gene mutation spectrum of thalassemia in different regions of China and Southeast Asia. Molecular genetics & genomic medicine. *7*(6), e680.

Zalloua PA, Shbaklo H, Mourad YA, Koussa S, Taher A. (2003). Incidence of thromboembolic events in Lebanese thalassemia intermedia patients. Thrombosis and Haemostasis. 89: 767-768.

Zertal-Zidani, S., Ducroq, R., Sahbatou, M., Satta, D., Krishnamoorthy, R. (2002). Foetal hemoglobin in normal healty adults: relationship with polymorphic sequence cis to the β globin gene. *Eur J Hum Genet*, 10: 320-326.



Annexes

Annexe 01: Concentement éclairé des patients (Français)

Patient **CHU Dorban Annaba**

Nom et prénom : **Service d'Hématologie**

Tel : **Dr : Djenouni A**

Adresse :

CONCENTEMENT ECRIT ET INFORMATION DU PATIENT

Conformément à la réglementation en vigueur,

Je consente et j'approuve que mon prélèvement sanguin soit envoyé au Laboratoire de biochimie des pathologies érythrocytaires Lyon, France pour des analyses génétiques (étude d'ADN)
J'ai discuté avec le médecin spécialiste du service et compris les bénéfices et risques, et j'approuve toutes les réponses et les conditions données :

J'approuve et j'accepte les conditions requises :

1. L'étude génétique ne donne pas toujours le résultat du profil génétique du patient, des informations spécifiques peuvent m'être communiquées.
2. L'étude de la mutation donne une donnée très précise sur l'origine de la maladie mais le risque d'erreur n'est pas exclu (contamination de l'échantillon)
3. Ce test d'ADN ne concerne que la pathologie recherché (hémoglobinopathies)
4. Les analyses sont complexes, nécessitent des réactifs et parfois des échantillons supplémentaires.
5. Après l'analyse génétique, les résultats obtenus peuvent être utilisés d'une façon anonyme dans des travaux de recherche.

Date :
Signature du patient :

Annexe 02 : Concentement éclairé en langue arabe

مستشفى دربان عنابة

مصلحة أمراض الدم

طلب موافقة المريض للمشاركة في بحث

عنوان البحث: دراسة بيولوجية و جزيئية لأمراض اعتلال الهيموغلوبين الوراثي

عزيزي المريض

الهـدف من الدراسة: البحث عن الجينات المسببة لمرض اعتلال الهيموغلوبين الوراثي بطريقة دقيقة و تحديد نوع الطفرة التي حدثت بشكل جد متطور و مقارنتها بالمعطيات العالمية.

عند مشاركتك في الدراسة ســوف يقوم الطبيب بتعبئة نموذج عن معلوماتك الشخصية و سوف نقوم بالاطلاع على ملفك العلاجي و من ثم سوف نقوم بأخذ عينة دم للدراسة الجينية.

في حالة وجود أي استفسارات الرجاء الإتصال على الرقم: 0792731488

أرغب في المشاركة في الدراسة وأوافـــق على ما ورد أعـــلاه.

التاريخ:

الإســم: ----------------------------------

التوقيع: ----------------------------------

Annexe 03 : Fiche de collécte des données des patients

Centre Hospitalier Universitaire

Hôpital Dorban

Service d'Hématologie médicale

Fiche d'exploitation des données

I. Identité du patient

-Nom et prénom :………………………………………………………………………..

-Age : ………………**-Sexe : M** ☐ **F** ☐

-Origine géographique: Wilaya :……………………Commune :……………………

-Origine ethnique : Père :……………………….. Mère :………………………...

II. Renseignements cliniques

-Age de découverte

- Circonstances de découverte :

……………………………………………………………………………………………

-Antécédents personnels

-Nombre de CVO par an

-STA

-AVC

-Priapisme

-splenectomie

-autres :

…………………………………………………………………………………………………

- Malade polytransfusé :

- **Notion de consanguinité**
- **Cas similaire dans la fratrie**
- **Examen clinique initial**

……………………………………………………………………………………………

III- Données biologiques

-Données hématologiques :

-L'hémogramme : Taux d'Hb ………………..Nombre de GR………………
Hématocrite…………. VGM………………..TCMH……………… CCMH :………
Plaquettes:…………….Leuco:………….

Taux de réticulocytes :…………….

-Frottis sanguin :

…………………………………………………………………………………………………
……………………………………………………………………………………

-Données biochimiques :

Bil T :……….Bil D :………….LDH :………. Ferritine :………….

TGP/TGO :………… Sérologie :……………….

-électrophorèse de l'Hb:

Hb A………………… Hb A2………………… Hb F ………………... ….

Hb S…………………. Hb C ……………………

-Enquête familial:

Electrophorèse du père

Electrophorèse de la mère

Arbre généalogique :

VI. Diagnostic Clinique:

Annexe 4 : Mode opératoire de l'extraction d'ADN par le kit Qiagen

Pour pouvoir extraire l'ADN presents dans le sang humain, 20µl de Protéase QIAGEN (Proteinase K) est transfèré dans un tube de lyse avec 200 µl d'échantillon de sang total. On ajouter 200 µl de tampon de lyse (Buffer AL) dans le tube de lyse et mélanger au moyen d'impulsions au vortex pendant 15sec. Pour assurer une lyse efficace, il est essentiel de bien mélanger l'échantillon et le tampon de lyse afin d'obtenir une solution homogène. Le tube de lyse est incubé pendant 10minutes à 56°C sur une plaque chauffante. On centrifuge le tube pendant 5secondes le tube de lyse à vitesse maximale pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon. 200 µl d'éthanol à 96% est ajouté dans le tube de lyse et bien mélangé pendant 15sec et centrifugé pendant 5 secondes à 14 tours par min.

On déposer avec précaution la totalité du lysat dans la colonne de centrifugation QIAMP mini sans en mouiller le bord et sans toucher la membrane de la colonne par le bout d'embout et on centrifuge à 8000 tours/min pendant 1min. La colonne est placé dans un nouveau tube de lavage et mettre le tube contenant le filtrat et ajouter 500 µl du tampon de lavage (Buffer Wash1) sans mouiller le bord de la colonne. On centrifuge la colonne à 8000 tours par min pendant 1minute et placer la colonne dans un nouveau tube de lavage. Pour la deuxième fois, 500 µl du Tampon du lavage 2 est ajouté à la colonne et centrifugé à nouveau à vitesse maximale 14000tours par min pendant 1 minute et la colonne est placée dans un nouveau tube de lavage. On centrifuge à nouveau pendant 3min à vitesse maximale pour sécher la membrane complètement.

On place la colonne de centrifugation dans un nouveau tube d'élution (Figure 13) et on ajoute avec précaution 200 µl du tampon d'élution et incube à température ambiante pendant 1min ensuite on procéde à une dernière centrifugation pendant 1minute à 8000 tours/min afin d'éluer l'ADN.

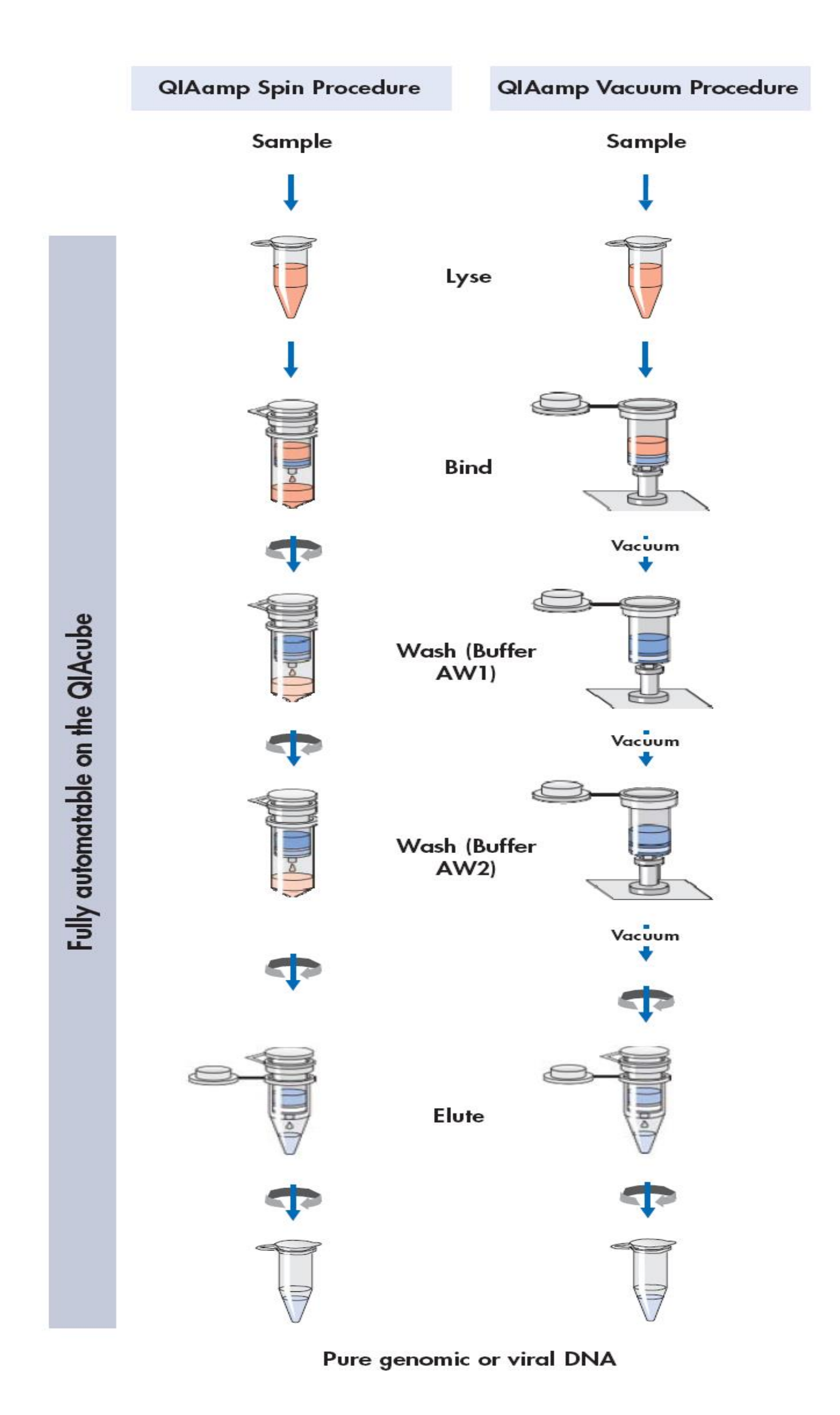


Figure 32**: Etapes de l'extraction d'ADN avec le kit QIAamp DNA Blood Mini (**Qiagen Handbook, 2016**)**

Résumé

Les hémoglobinopathies sont des maladies autosomiques héréditaires très répandues dans le bassin méditerranéen. Le diagnostic de la bêta thalassémie et l'anémie falciforme nécessite la caractérisation du gène de la bêta globine qui porte l'allèle anormal responsable de la maladie. La bêta-thalassémie est une maladie génétique représentant un problème de santé majeur en Algérie vu la difficulté de la prise en charge et les complications mortelles. Notre premier objectif était de déterminer les fréquences alléliques et le spectre moléculaire des mutations β-thal chez les patients atteints de thalassémie majeure et intermédiaire et de drépanocytose dans trois wilayas du Nord-Est de l'Algérie. Notre deuxième objectif était d'évaluer si la prise en charge clinique des patients β-thal dépendait de leur origine. Notre dernier objectif était d'évaluer pour la première fois pour une population originaire du Maghreb, la fiabilité du score de gravité de la thalassémie (TSS) pour les patients atteints de β-thalassémie homozygote. Le séquençage direct du gène HBB Sanger a été effectué sur 59 patients atteints de drépanocytose et 60 atteints de β-thalassémie majeure. Pour ces derniers patients, les modificateurs génétiques du TSS ont été génotypés: deletions α-thalassémie (α-thal) et quatre polymorphismes induisant l'Hb F (XmnI, rs1427407 et rs10189857 pour BCL11A et rs9399137 pour HMIP). Onze mutations β-thal différentes ont été trouvées mais deux d'entre elles (HBB: c.118C> T et HBB: c.93-21G> A) représentaient environ 70,0% de l'ensemble des allèles β-thal identifiés. Une proportion relativement élevée de génotypes HbS (HBB: c.20A> T) / β-thal (27,0%) a été trouvée dans notre population de drépanocytose où une nouvelle mutation β ° -thal de décalage de cadre (HBB: c.374dup; p.Pro126Thrfs_15) a été identifié. Aucune différence dans la prise en charge clinique n'a été trouvée dans les trois provinces. Sur les 60 patients β-thal majeurs, ceux avec un TSS élevé ou très élevé étaient significativement plus jeunes à l'âge de la première transfusion, validant ainsi la fiabilité de ce système de notation dans une cohorte maghrébine. Des tendances pour un âge inférieur de splénectomie et des niveaux élevés de ferritine ont également été détectées pour les catégories de TSS supérieures.

Mots clés : Béta thalassémie, drépanocytose, séquençage, mutation, TSS score.

Abstract

Hemoglobinopathies are hereditary autosomic diseases that are widespread in the mediterranean basin. The diagnosis of beta thalassemia and sickle cell anemia require the caracterization of beta globin gene which carries the abnormal allele responsible of the disease. Beta thalassemia is a genetic disorder representing a major health problem in Algeria. Our first objective was to determine the allelic frequencies and molecular spectrum of β-thal mutations in patients with major and intermediate thalassemia and sickle cell syndrome in three provinces of northeast Algeria. Our second objective was to assess if the clinical management of β-thal patients depended on their origin. Our last objective was to assess for the first time for a population originating from Maghreb, the reliability of the thalassemia severity score (TSS) for patients with homozygous β-thalassemia. Direct Sanger HBB gene sequencing was performed on 59 patients with sickle cell disease and 60 with major β-thalassemia. For the latter patients, the genetic modifiers of the TSS were genotyped: α-thalassemia (α-thal) deletions and four Hb F-inducing polymorphisms (XmnI, rs1427407 and rs10189857 for BCL11A and rs9399137 for HMIP). Eleven different β-thal mutations were found but two of them (HBB: c.118C>T and HBB: c.93-21G>A) accounted for about 70.0% of the β-thal alleles. A relatively high proportion of Hb S (HBB: c.20A>T)/β-thal genotypes (27.0%) was found in our sickle cell disease population where a new frameshift β°-thal mutation (HBB: c.374dup; p.Pro126Thrfs_15) was identified. No difference in the clinical management was found in the three provinces. Of the 60 major β-thal patients, those with a high or very high TSS were significantly younger at the age of first transfusion, thus assessing the reliability of this scoring system in a Maghrebin cohort. Trends for a lower age of splenectomy and high ferritin levels were also detected for the higher TSS categories.

Keywords: Beta thalassemia, Sickle cell syndrom, Direct Sequencing, Mutation, QTLs of HbF, TSS score.

الملخص

الملخص:

أمراض خضاب الدم هي من الأمراض الوراثية المنتشرة على نطاق واسع في حوض البحر الأبيض المتوسط. يتطلب تشخيص الثلاسيميا و فقر الدم المنجلي دراسة معمقة لجين بيتا غلوبين الذي يحمل الطفرة الوراثية المسؤولة عن المرض. الثلاسيميا من نوع بيتا تمثل مشكلة صحية رئيسية في الجزائر نظرا لصعوبة التشخيص و العلاج. و كان هدفنا الاول في هذه الدراسة هو تحديد عدد الاليلات التي تحمل الطفرات الوراثية المسؤولة عن المرض لدى المصابين بالثلاسيميا و فقر الدم المنجلي في ثلاث ولايات من شمال شرق الجزائرعنابة قالمة و الطارف. و كان الهدف الثاني هو تقييم التكفل الطبي بالمرضى ان كان يختلف او لا على حسب الولاية. اما الهدف الاخير كان ان هو تقييم مدى موثوقية درجة شدة الثلاسيميا للمرضى المصابين للمرة الأولى بالنسبة إلى مجموعة من سكان المغرب العربي.
تم إجراء تسلسل للنكليوتيدات لجين بيتا غلوبين على 59 مريضًا مصابون بمرض فقر الدم المنجلي و60 مريضًا مصابون بالثالاسميا. وبالنسبة للمرضى الآخرين، كانت المعدّلات الجينية لخدمات الدعم التقني هي: عمليات حذف ألفا ثلاسيميا (ألفا (وأربع أشكال متعددة الحفز XmnI) HB و rs1427407و rs10189857لـ BCL11A و rs9399137لـ HMIP). تم العثور على أحد عشر طفرة مختلفة لخطوبة بيتائية لكن اثنين منها كانت موجودة لدى مجموعة كبيرة حوالي 70 % من المرضى, وتم العثور ايضا على نسبة عالية من الهيموغلوبين س المرتبط بالبيتا الثالاسيميا مع ظهور طفرة وراثية جديدة عند أحد مرضى فقر الدم المنجلي.ولم يتم العثور على أي فرق في التسيير السريري للمرضى في الولايات الثلاث .ومن بين 60 مريضاً من كبار المرضى المصابين بالثالاسيميا ، كان هؤلاء الذين يتمتعون بعلامة score TSS عالية للغاية يبداوون نقل الدم في عمر مبكر جدا، وبالتالي فإننا استطعنا تاكيد فعالية score TSS في مجموعة مغاربية لاول مرة .كما تم اكتشاف اتجاهات انخفاض عمر استئصال الطحال ومستويات مخزون الحديد المرتفعة لفئات التي تتمتع ب score TSS عالي.

الكلمات المفتاحية: البيتا ثالاسيميا, فقر الدم المنجلي, شرق الجزائر, طفرة وراثية, جينات.

ISSN: 0363-0269 (Print) 1532-432X (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/ihem20

Genetic Background of β-Thalassemia in Northeast Algeria with Assessment of the Thalassemia Severity Score and Description of a new β^0-Thalassemia Frameshift Mutation (*HBB*: c.374dup; p.Pro126Thrfs*15)

Wissem Abdaoui, Djamel Eddine Benouareth, Amel Djenouni, Celine Renoux, Fatiha Grifi, Adel Gouri, Fateh Athamnia, Manel Benalioua & Philippe Joly

HEMOGLOBIN
https://doi.org/10.1080/03630269.2019.1675689



ORIGINAL ARTICLE



Genetic Background of β-Thalassemia in Northeast Algeria with Assessment of the Thalassemia Severity Score and Description of a new β^0-Thalassemia Frameshift Mutation (*HBB*: c.374dup; p.Pro126Thrfs*15)

Wissem Abdaoui[a], Djamel Eddine Benouareth[a], Amel Djenouni[b], Celine Renoux[c,d], Fatiha Grifi[b], Adel Gouri[b], Fateh Athamnia[e,f], Manel Benalioua[b] and Philippe Joly[c,d]

[a]Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université 8 mai 1945, BP 401 Guelma 24000, Algérie; [b]Service D'Hématologie, Centre Hospitalo-Universitaire D'Annaba, Annaba, Algérie; [c]Unité Fonctionnelle 34445 'Biochimie Des Pathologies Érythrocytaires,' Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand-Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; [d]Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) EA7424, Equipe «Biologie vasculaire du globule rouge», Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France; [e]Service d'épidémiologie, Direction de Santé Publique, Guelma, Algérie; [f]Laboratoire de Biochimie, Collège de Médecine, Annaba 23000, Algérie

ABSTRACT

β-Thalassemia (β-thal) is a genetic disorder representing a major health problem in Algeria. Our first objective was to determine the allelic frequencies and molecular spectrum of β-thal mutations in patients with major hemoglobinopathies [β-thal major (β-TM) and sickle cell disease] in three provinces of northeast Algeria. Our second objective was to assess if the clinical management of β-TM patients depended on their region of origin. Our last objective was to assess a population originating from Maghreb, the reliability of the thalassemia severity score (TSS) for patients with homozygous β-thal. Sanger *HBB* gene sequencing was performed on 59 patients with sickle cell disease and 60 with β-TM. For the latter patients, the genetic modifiers of the TSS were genotyped: α-thalassemia (α-thal) deletions and four Hb F-inducing polymorphisms (*Xmn*I, rs1427407 and rs10189857 for *BCL11A* and rs9399137 for *HMIP*). Eleven different β-thal mutations were found but two of them (*HBB*: c.118C>T and *HBB*: c.93-21G>A) accounted for about 70.0% of the β-thal alleles. A relatively high proportion of Hb S (*HBB*: c.20A>T)/β-thal genotypes (27.0%) was found in our sickle cell disease cohort where a new frameshift β^0-thal mutation (*HBB*: c.374dup; p.Pro126Thrfs*15) was identified. No difference was found in the three provinces. Of the 60 β-TM patients, those with a high or very high TSS were significantly younger at the age of first transfusion, thus assessing the reliability of this scoring system in a Maghrebin cohort. Trends for a lower age of splenectomy and high ferritin levels were also detected for the higher TSS categories.

ARTICLE HISTORY
Received 5 September 2019
Revised 16 September 2019
Accepted 17 September 2019

KEYWORDS
Algeria; epidemiology; β-thalassemia (β-thal) mutation; Hb F quantitative trait loci (QTLs); thalassemia severity score (TSS)

Introduction

β-Thalassemia (β-thal) is one of the most common recessive monogenic disorders worldwide with a high prevalence in Mediterranean, Middle Eastern and Indian populations. Population migration and intermarriage between different ethnic groups have introduced it in almost every country of the world, including Northern Europe [1]. More than 300 β-thal alleles have been reported so far in the HbVar database (http://globin.bx.psu.edu/hbvar) [2]. However, a few alleles only account for more than 80.0% of cases in restricted geographical areas due to a genetic founder effect in autochthone populations. Knowledge of the local β-thal mutational spectrum is thus particularly important in developing countries where Sanger direct sequencing is not routinely available and where only simpler techniques can be used for molecular characterization of targeted β-thal mutations. In Maghreb countries, the prevalence of β-thal alleles ranges from 1.5 to 4.8% in the general population and is about 3.0% in Algeria [3]. In this country, previous investigations revealed a high molecular heterogeneity of β-thal mutations due to the successive invasions and foreign settlements that characterize Algerian history [4–7]. However, these studies focused on Algiers and not on the provinces of northeast Algeria where the genetic admixture may be less important. Moreover, the relative occurrence of Hb S/β-thal and β^S/β^S (*HBB*: c.20A>T) genotypes in sickle cell disease patients in Algeria are not known. These two considerations are important and qualify for a precise answer in order to assess a documented strategy for prenatal diagnosis of hemoglobinopathies when direct Sanger sequencing of the *HBB* gene is not routinely available [8].

In homozygous β-thal, primary genetic modifiers include genetic variants able to reduce the globin chain imbalance, thereby resulting in a milder form of thalassemia. The historical ones are concurrence of α-thalassemia (α-thal), the nature (β^0- or β^+-) of the β-thal mutations and allelic status of the *Xmn*I polymorphism (rs7842144) in the promoter

CONTACT Dr. Philippe Joly philippe.joly@chu-lyon.fr Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand-Est, Groupement Hospitalier Est, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron, France

region of the *HBG2* gene, which is associated with a persistently higher Hb F level. Ten years ago, genome-wide association studies identified other Hb F quantitative trait loci (Hb F QTLs) outside of the β-globin cluster in intron 2 of the *BCL11A* gene (chromosome 2) and in the *HBS1L-MYB* (HMIP) inter-genic region (chromosome 6) [9]. In order to predict early in life the clinical evolution of homozygous β-thal children towards the β-thal major (β-TM) or the β-thal intermedia (β-TI) form of the disease, a prediction score using these different genetic modifiers, namely the thalassemia severity score (TSS), was set up [10,11]. This TSS, which can be determined *via* a freely available web-calculator (http://tss.unica.it/home), allows us to roughly predict the age of the first blood transfusion for homozygous β-thal patients. However, so far it has never been validated on patients originating from Maghreb where the β-thal mutational spectrum and the genetic background of Hb F QTLs can be different from Italy where the algorithm was developed and is routinely applied.

Our first objective was to determine the allelic frequencies and variants spectrum of β-thal mutations in patients with major β hemoglobinopathies (β-TM or β-TI and sickle cell disease) in three provinces of northeast Algeria, namely Annaba, Guelma and Eltaref. Because of differences in healthcare status in these three provinces, our second objective was to assess if the clinical evolution of β-thal depended on the region of origin. Our last objective was to assess for the first time the validity of the TSS in a population originating from Maghreb.

Materials and methods

Sixty β-TM patients (27 males, 33 females) aged between 17 and 37 years old and originating from northeast Algeria (Annaba 34 patients, Guelma 14 patients and Eltaref 12 patients) were consecutively recruited between October 2017 and January 2018 at the Dorban Hospital, (Annaba, Algeria). Their enrollment was performed during routine follow-up visits or during hospitalization for a β-thal-related complications. Fifty-nine patients with sickle cell disease were also recruited in order to determine the proportion of Hb S/β-thal genotypes among them.

For the 60 β-thal patients, medical records were retrospectively reviewed by a physician specialized in hemoglobinopathies to recover the following clinical and biological parameters: (i) age of diagnosis with the hemoglobin (Hb), hematocrit or packed cell volume (PCV), platelets and white blood cell (WBC) values recorded at that time, (ii) age of the first transfusion, (iii) age of splenectomy (if performed) and (iv) values of serum ferritin, total bilirubin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), uric acid and hepatitis C virus (HCV) serology status during the last pre transfusion follow-up visit. Sex, age at recruitment and consanguinity (if applicable) were also recorded.

In accordance with the Helsinki declaration, the patient or the legal caregivers gave their written informed consent for genetic analysis of hemoglobinopathies (including modifier genes). The study was approved by the Ethics committee of Dorban Hospital, Annaba, Algeria. DNA was extracted from peripheral blood mixed with EDTA using the QIAmp® DSP DNA Blood Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). All genotypic analyses were performed at Lyon (France) at the Biochemical Laboratory of the Center de Biologie Est (Hospices Civils de Lyon), which specializes in the genetic diagnosis of hemoglobinopathies. Direct Sanger sequencing of the *HBB* gene was performed on an ABI PRISM® *3130xl* Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for both β-thal patients and sickle cell disease patients, while the α-thal status and the Hb F QTLs of the TSS were determined for the β-thal patients only.

The five most frequent α-thal [*i.e.* $-\alpha^{3.7}$ (rightward), $-\alpha^{4.2}$ (leftward), $-(\alpha)^{20.5}$, Southeast Asian ($--^{SEA}$) and Mediterranean ($--^{MED}$)] deletions were screened by a dedicated multiplex gap-polymerase chain reaction (gap-PCR) [12]. The *Xmn*I polymorphism was genotyped with a dedicated fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay on Light Cycler 480® (Roche Diagnostics, Meylan, France) [13]. The other single nucleotide polymorphisms (SNPs) participating in the TSS computation (namely rs1427407 and rs10189857 for *BCL11A* and rs9399137 for *HMIP*) were genotyped by in-house high-resolution melting (HRM) protocols on Light Cycler 480® (Roche Diagnostics). When atypical or doubtful HRM profiles were observed, confirmation was made with the β-Thalassemia Modifier StripAssay kit (ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria) that is a reverse dot-blot kit for the simultaneous genotyping of these four Hb F QTLs.

The TSS was determined for each patient from the results of the α-globin, β-globin and Hb F QTLs genotyping. The classification of the β-thal defects as β^0- or β^+-thal mutations was done as indicated in the supplemental data of Danjou *et al.* [11]. Thereafter, each patient was classified according to the value of his/her TSS in one of the following categories: (i) low severity (TSS<3), (ii) mild severity (3 ≤TSS<5), (iii) high severity (5≤TSS <7), and (iv) very high severity (TSS>7).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 22 (https://ibm.com/SPSS-Statistics/). The significance level was defined at $p < 0.05$. Continuous variables were reported as mean ± standard deviation (SD) and categorical variables as number (n) or frequency. The χ^2 test was used to compare the allelic frequencies of the different mutations and polymorphisms in the three provinces of northeast Algeria. It was also used to compare the frequency of qualitative clinical events between the three provinces and between the four TSS categories. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the mean values of the quantitative biological and clinical parameters between the three provinces and between the four TSS groups.

Results

The genotypic data of the 60 β-TM or β-TI patients are presented in Table 1, according to their province of origin (Annaba, Guelma and Eltaref). Two mutations accounted for 69.0% of the β-thal alleles of the overall cohort. The first one is the nonsense β^0-thal mutation on codon 39 (*HBB*: c.118C>T) and the second one the intronic IVS-I-110 G>A (*HBB*: c.93-21G>A) β^+-thal mutation. The other β-thal alleles were distributed between nine different β-thal mutations. α-Thalassemia deletions were quite rare with only 11 deleted alleles out of 120; 10 patients heterozygous for the $-\alpha^{3.7}$ deletion and one for the $--^{MED}$ deletion. The allelic frequencies of the four studied Hb F QTLs ranged from 8 (for *Xmn*I) to 34.0% (for *BCL11A* rs1427407). No difference was observed in the three provinces for the mutational β-thal spectrum or for the allelic frequencies of α-thal deletions and Hb F QTLs.

The β-globin genotyping of the 59 patients with sickle cell disease revealed 43 β^S/β^S and 16 β^S/β-thal patients (about 27.0%). The β-thal mutational spectrum of these 16 patients was very close to that of the 60 patients with β-TM or β-TI (*n* = eight *HBB*: c.118C>T, *n* = three *HBB*: c.20delA, *n* = two *HBB*: c.92+1G>A, *n* = one *HBB*: c.25_26delAA and *n* = one *HBB*: c.93-21G>A) except for a novel frameshift allele (*HBB*: c.374dup; p.Pro126Thrfs*15), which was discovered in a 21-year-old male (Figure 1). This patient exhibited a regenerative microcytic and hypochromic anemia without any associated α-thal deletion: Hb 6.6 g/dL, mean corpuscular volume (MCV) 72.8 fL, mean corpuscular Hb (MCH) 18.9 pg, mean corpuscular Hb concentration (MCHC) 29.9 g/L and platelets 321.0×10^9/L.

The epidemiological, biological and clinical data of the β-thal population are presented in Table 2. As to the whole cohort, the most interesting data were the very high rate of consanguinity (near 50.0%), the very high ferritin levels (mean 3836 μg/L) and the strong transfusion regimen (mean transfusion interval 3.2 weeks). Six patients out of 60 (10.0%) had a positive HCV serology. No difference in the three provinces was observed for the studied parameters.

The same epidemiological, biological and clinical data according to the TSS category of the patients are presented in Table 3. A higher TSS category was associated with a lower age of first transfusion. Although significance was not actually established, strong trends for a lower age of splenectomy and for higher ferritin levels were also observed for patients of the high ($5 \leq$ TSS <7) and very high (TSS >7) severity groups.

Table 1. Distribution and allele frequencies of β- and α-thalassemia defects and of the five Hb F quantitative trait loci in the 60 patients with β-thalassemia major and β-thalassemia intermedia, according to their province of origin.

Mutations	All Population		Annaba	Guelma	Eltaref	
β-Thal (*HBB*:)	Alleles (*n*)	% or AF	Alleles (*n*)	Alleles (*n*)	Alleles (*n*)	*p* Value[a]
c.118C>T	52	43.0	27	11	14	.60
c.93-21G>A	31	26.0	19	7	5	.86
c.92 + 1G>A	12					
c.20delA	8					
c.25-26delAA	2					
c.92 + 1G>T	3					
c.-79A>G	4	31.0	25	9	5	.57
c.114G>A	2					
c.135delC	2					
c.92 + 6T>C	1					
c.316-3C>A	3					
Total	120	100.0	68	28	24	
α-Thal	Alleles (*n*)	% or AF	Alleles (*n*)	Alleles (*n*)	Alleles (*n*)	*p* Value[a]
$-\alpha^{3.7}$	10	0.08	4	3	3	.58
$-(\alpha)^{20.5}$	0	0.0	–	–	–	
$--^{MED}$	1	0.008	1	0	0	.68
Hb F QTLs	Alleles (*n*)	% or AF	Alleles (*n*)	Alleles (*n*)	Alleles (*n*)	*p* Value[a]
rs7482144[b]	10	0.08	6	3	1	.72
rs1427407[c]	19	0.15	13	1	5	.19
rs10189857[c]	41	0.34	21	11	9	.83
rs9399137[d]	22	0.18	16	3	3	.37

HBB: β-globin chain; AF: allele frequencies; QTLs: quantitative trait loci.
[a] *p* Values were determined by the χ^2 test.
[b] XmnI polymorphism.
[c] BCL11A polymorphisms.
[d] HMIP polymorphism.
Data are expressed either as number of individuals (*n*) or as percentages or allele frequencies.

Discussion

Regarding the first objective set, our results confirm the high molecular heterogeneity of β-thal alleles in Algeria [12] with more than 10 different β-thal alleles identified. However, two particular mutations [β^0 codon 39 (C>T) and β^+ IVSI-110 (G>A)] accounted for more than 69.0% of

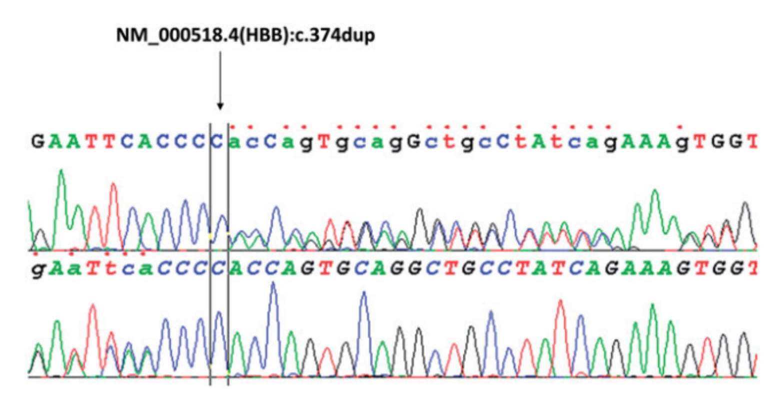


Figure 1. Sanger sequencing of the new frameshift β^0-thal mutation (*HBB*: c.374dup; p.Pro126Thrfs*15).

Table 2. Epidemiological, biological and clinical characteristics of the 60 patients with β-thalassemia major (β-TM) and β-thalassemia intermedia (β-TI), according to their province of origin.

Parameters	β-TM and β-TI	Annaba	Guelma	Eltaref	*p* Value[a]
Epidemiological	*n* = 60	*n* = 34	*n* = 14	*n* = 12	
Age (years)	22.8 ± 4.8	23.1 ± 5.4	23.7 ± 3.4	21.0 ± 4.6	.33
Sex	27 M; 33 F	13 M; 22 F	10 M; 4 F	5 M; 7 F	.47
Consanguinity (*n*)	28	12	8	8	.47
Biological D_X					
Hb (g/dL)	6.1 ± 1.9	6.4 ± 1.8	6.1 ± 1.8	5.4 ± 2.5	.30
PCV (L/L)	0.19 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.16 ± 0.05	0.18 ± 0.05	.11
WBC (10^9/L)	17.3 ± 17.8	15.2 ± 12.0	10.2 ± 9.4	26.9 ± 28.7	.09
Platelets (10^9/L)	439.0 ± 291.0	430.0 ± 275.0	465.0 ± 353.0	441.0 ± 308.0	.96
Hb F (%)	82.0 ± 24.0	81.0 ± 28.0	86.0 ± 25.0	86.0 ± 15.0	.85
Before Transfusion					
Ferritin (μg/L)	3836.0 ± 2497.0	3318.0 ± 1976.0	5037.0 ± 3537.0	4056.0 ± 2329.0	.12
Total bilirubin (μmol/L)	39.0 ± 26.0	37.0 ± 23.0	47.0 ± 37.0	35.0 ± 19.0	.43
AST (UI/L)	46.0 ± 25.0	48.0 ± 27.0	41.0 ± -21.0	48.0 ± 26.0	.74
ALT (UI/L)	49.0 ± 31.0	50.0 ± 32.0	45.0 ± 30.0	51.0 ± 32.0	.88
ALP (UI/L)	316.0 ± 231.0	335.0 ± 267.0	260.0 ± 117.0	322.0 ± 223.0	.62
Uric acid (μmol/L)	281.0 ± 120.0	275.0 ± 119.0	318.0 ± 126.0	250.0 ± 122.0	.53
Clinical					
Positive HCV serology (*n*)	6	4	2	0	.47
Age at D_X (*n*)	17 ± 23	15 ± 24	25 ± 26	11 ± 8	.25
Splenectomized (*n*)	42	23	8	11	.72
Age splenectomized (years)	9.6 ± 3.7	9.8 ± 3.0	8.6 ± 4.9	9.9 ± 4.4	.72
Transfusion interval (weeks)	3.2 ± 0.9	3.1 ± 0.6	3.5 ± 1.5	3.4 ± 0.5	.24
Age at first transfusion (months)	22 ± 35	24 ± 44	22 ± 22	14 ± 14	.72

Biological D_X: biological diagnosis; Hb: hemoglobin; PCV: packed cell volume; WBC: white blood cell count; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; HCV: hepatitis C virus.
[a] *p* Values were determined by the one-way analysis of variance (ANOVA) test.
Data are expressed either as number of individuals (*n*) or mean ± standard deviation.

Table 3. Clinical and biological .characteristics of the 60 patients with β-thalassemia major and β-thalassemia intermedia according to the thalassemia severity score category.

Parameters	Low Severity Score (TSS <3)	Mild Severity Score (3 <TSS <5)	High Severity Score (5 <TSS <7)	Very High Severity Score (TSS >7)	*p* Value[a]
Clinical	*n* = 15	*n* = 8	*n* = 15	*n* = 7	
Age at first transfusion (months)	29 ± 31	57 ± 77	14 ± 10	8 ± 6	.004
Positive HCV serology (*n*)	1	1	2	2	.95
Age at D_X (months)	24 ± 27	30 ± 44	10 ± 7	11 ± 10	.122
Splenectomized (*n*)	7	6	12	17	.80
Age splenectomized (years)	12.1 ± 4.6	9.1 ± 3.0	10.4 ± 3.3	8.0 ± 3.3	.072
Transfusion interval (weeks)	3.4 ± 1.4	3.0 ± 0.5	3.3 ± 0.6	3.1 ± 0.5	.601
Biological D_X					
Hb (g/dL)	6.4 ± 1.8	5.4 ± 2.9	6.0 ± 1.7	6.2 ± 1.8	.739
PCV (L/L)	0.17 ± 0.07	0.20 ± 0.40	0.19 ± 0.05	0.21 ± 0.03	.441
WBC (10^9/L)	10.2 ± 10.2	16.8 ± 14.3	15.8 ± 13.4	24.7 ± 25.1	.222
Platelets (10^9/L)	414.0 ± 327.0	346.0 ± 254.0	430.0 ± 280.0	508.0 ± 296.0	.693
Hb F (%)	76.0 ± 34.0	89.0 ± 11.0	89.0 ± 17.0	76.0 ± 28.0	.59
Before Transfusion					
Ferritin (μg/L)	2806.0 ± 1780.0	2785.0 ± 1345.0	4699.0 ± 3496.0	4328.0 ± 2107.0	.091
Total bilirubin (μmol/L)	40.0 ± 24.0	36.0 ± 5.0	47.0 ± 29.0	32.0v27.0	.426
AST (UI/L)	42.0 ± 25.0	55.0 ± 16.0	46.0 ± 29.0	45.0 ± 25.0	.731
ALT (UI/L)	44.0 ± 26.0	60.0 ± 21.0	46.0 ± 39.0	49.0 ± 31.0	.703
ALP (UI/L)	337.0 ± 378.0	375.0 ± 230.0	305.0 ± 133.0	286.0 ± 138.0	.818
Uric acid (μmol/L)	296.0 ± 125.0	321.0 ± 114.0	284.0 ± 137.0	254.0 ± 108.0	.728

TSS: thalassemia severity score; Biological D_X: biological diagnosis; Hb: hemoglobin; PCV: packed cell volume; WBC: white blood cell count; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; HCV: hepatitis C virus.
[a] *p* Values were determined by the one-way analysis of variance (ANOVA) test.
Data are expressed as number (*n*) or mean ± standard deviation.

β-thal alleles, very similar to previously reported for the Algerian (52.3%) [6] and Tunisian (62.2%) cohorts [14,15]. The nonsense β^0 codon 39 mutation is highly prevalent in areas surrounding Algiers and in the western part of the country, around the city of Oran [7]. It may have originated from the former Roman Empire, explaining its wide distribution within the Mediterranean Basin [16]. The IVS-I-110 mutation is the most frequent β-thal mutation in the Turkish population. Its distribution is closely related to the geographical diffusion of the Ottoman Empire between the 16th and 19th centuries in North Africa [17]. These two mutations can easily be identified by simple PCR-based methods, such as amplification refractory mutation system (ARMS) that is based on allelic-specific priming [18–20]. Another simple and reliable way for laboratories without access to Sanger sequencing is the use of the reverse dot-blot β-Globin StripAssay® MED

hybridization kit (ViennaLab Diagnostics GmbH) that allows the genotyping of the 22 more frequent β-thal mutations in the Mediterranean Basin [21]. If it had been applied to our cohort of 60 β-TM or β-TI patients, it would have identified all the different β-thal alleles except three [*HBB*: c.92+1G>T, *HBB*: c.79A>G (Hb E) and *HBB*: c.114G>A], which corresponded to 111 alleles out of 120 (92.5%). Fifty-one patients out of 60 would have been entirely genotyped for their β-thal syndrome.

Very interestingly, the percentage of Hb S/β-thal genotypes in sickle cell disease patients was very high in our cohort (27.0%) when compared to European or West African sickle cell disease cohorts where these patients account for less than 5.0% [22,23]. Similar proportions of Hb S/β-thal genotypes were found in other cohorts from Maghreb: 25.0% in Tunisia [8] and 16.7% in Morocco [24]. This over representation of Hb S/β-thal profiles in North Africa compared with Black Africa may reflect the higher prevalence of β-thal in those countries but also a higher level of consanguinity, particularly in rural areas where the frequency of first-cousin marriages may be as high as 25.0–30.0% [25]. However, *de novo* mutations also occur, as reflected by the newly identified frameshift mutation (*HBB*: c.374dup; p.Pro126Thrfs*15). As it is located in the third and last exon of the *HBB* gene, one may speculate that the truncated mRNA is not degraded by the nonsense mediated decay (NMD) mechanism [26], thus giving rise to a very unstable protein. That may explain the very severe microcytic and hypochromic anemia of the proband. Except for this patient, all the Hb S/β-thal genotypes of our cohort would have been identified by the β-Globin StripAssay® MED kit (ViennaLab Diagnostics GmbH).

No difference of allelic frequency was observed in the three provinces of northeast Algeria for both the different β-thal/α-thal defects and the four studied Hb F QTLs. In a practical way, it means that there is no founder effect in a province that may have resulted in an over representation of a particular genotype. Allelic frequencies for α-thal (11/120, about 9.2%) and for the *Xmn*I polymorphism (10/120, 8.0%) confirmed the literature data already available from North Africa: 4.6% for α-thal in Algeria [27] and 8.3% for *Xmn*I in an Egyptian population [28]. On the other hand, our study is the first one to have studied *BCL11A* and *HMIP* polymorphisms in a North African cohort. Overall, the allelic frequencies of favorable β-thal modifiers observed in our cohort are quite low compared to Italian or Sardinian patients, mainly for α-thal, *Xmn*I and *HMIP* rs9399137 [10,11]. This strongly suggests a higher clinical severity for homozygous β-thal patients originating from Maghreb compared with Italy and Sardinia. The clinical data of our patients do confirm this statement as they present a very low mean Hb level (6.1 g/dL), a very young age of first transfusion (about 2 years old) and a strong transfusion regimen (every 3 weeks) leading to a major hyper-ferritinemia (>2500.0 μg/L). This latter point underlines the quasi-absence of chelation therapy in Maghreb, which represents a real problem for the long-term follow-up of β-TM patients in Algeria. The quite high frequency of HCV-positive patients (10/60, 10.0%) is also to be noted as a consequence of an insufficient transfusion safety in Maghreb. Despite obvious differences in medical facilities (qualified doctors and drug supply) in the three provinces of northeast Algeria, no difference was noted in the clinical evolution of β-TM patients, a conclusion answering our second objective as set above.

Regarding our third declared objective, the present study presents, to the best of our knowledge, the first cross-validation of the TSS in a North African population. Despite a quite different genetic background for the β-thal modifier genes, this scoring system also discriminates patients very well regarding the age of the first transfusion, which is clearly reduced for the high and very high severity categories. Contrary to Danjou *et al.* [11] who only considered a single clinical end-point, we also tested the discriminating power of the TSS for many other clinical and biological parameters. A tendency for an earlier age of splenectomy and for higher ferritin levels was observed for patients of the higher TSS categories. It would be interesting to check these points in European cohorts with a better medical follow-up and to check the validity of the TSS when β^{+}-thal mutations are much more common, such as in Southeast Asia where Hb E/β-thal patients are very frequent [29].

Conclusions

In conclusion, our study confirms the high prevalence and molecular heterogeneity of β-thal mutations in Algeria. Two particular molecular defects accounting for about 70.0% of all β-thal alleles (whatever the region of origin), the genotyping method employed must at least be able to detect these reliably. Considering the difficulties encountered by physicians for the correct management of β-TM patients (unavailability of chelation therapy and insufficient transfusion safety), the use of the TSS for prediction of severity may be of particular importance to adapt the transfusion regimen.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

Author contributions

W. Abdaoui was the principal investigator who coordinated the research, wrote the first draft of the manuscript and takes primary responsibility; P. Joly supervised the genotyping analyses in France and closely reviewed the manuscript; D. E. Benouareth, A. Djenouni, F. Grifi and M. Benalioua supervised the recruitment in the hematology department in Algeria and/or helped; P. Joly and C. Renoux helped with the genetic data collection and/or HRM methodology; A. Gouri and F. Athamnia helped in the statistical analyses.

References

[1] Cao A, Gossens M, Pirastu M. β Thalassaemia mutations in Mediterranean populations. Br J Haematol. 2008;71(3):309–312.

[2] Patrinos GP, Giardine B, Riemer C, *et al.* Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia

mutations for population and sequence variation studies. Nucleic Acids Res. 2004;32(Database issue):D537–D541.
[3] Labie D, Bennani C, Beldjord C. β-Thalassemia in Algeria. Ann NY Acad Sci. 1990;612:43–54.
[4] Bennani C, Bouhass R, Perrin-Pecontal P, *et al.* Anthropological approach to the heterogeneity of β-thalassemia mutations in northern Africa . Hum Biol. 1994;66(3):369–382.
[5] Bennani C, Tamouza R, Rouabhi F, *et al.* The spectrum of β-thalassaemia in Algeria: possible origins of the molecular heterogeneity and a tentative diagnostic strategy. Br J Haematol. 1993;84(2):335–337.
[6] Boudrahem-Addour N, Zidani N, Carion N, *et al.* Molecular heterogeneity of β-thalassemia in Algeria: how to face up to a major health problem. Hemoglobin. 2009;33(1):24–36.
[7] Bouhass R, Perrin P, Trabuchet G. The spectrum of β-thalassemia mutations in the Oran region of Algeria. Hemoglobin. 1994;18(3): 211–219.
[8] Ouali F, Siala H, Bibi A, *et al.* Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Tunisia: an 18 years of experience. Int J Lab Hem. 2016;38(3):223–232.
[9] Thein SL. Genetic basis and genetic modifiers of β-thalassemia and sickle cell disease. Adv Exp Med Biol. 2017;1013:27–57.
[10] Danjou F, Anni F, Perseu L, *et al.* Genetic modifiers of β-thalassemia and clinical severity as assessed by age at first transfusion. Haematologica. 2012;97(7):989–993.
[11] Danjou F, Francavilla M, Anni F, *et al.* A genetic score for the prediction of β-thalassemia severity. Haematologica. 2015; 100(4):452–457.
[12] Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, *et al.* Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of β-thalassemia. Blood. 2000;95(1):360–362.
[13] Joly P, Lacan P, Garcia C, *et al.* Rapid and reliable β-globin gene cluster haplotyping of sickle cell disease patients by FRET Light Cycler and HRM assays. Clin Chim Acta. 2011;412(13-14):1257–1261.
[14] Fattoum S, Messaoud T, Bibi A. Molecular basis of β-thalassemia in the population of Tunisia. Hemoglobin. 2004;28(3):177–187.
[15] Jouini L, Sahli CA, Laaouini N, *et al.* Association between clinical expression and molecular heterogeneity in β-thalassemia Tunisian patients. Mol Biol Rep. 2013;40(11):6205–6212.
[16] Labie D, Benabadji M, Elion J. Genetic disorders in North African populations of the Maghreb: Morocco, Algeria and Tunisia. In: Teebi AS, Farag TI, Editors. Genetic Disorders Among Arab Populations. New York (NY, USA): Oxford University Press. 1995. 290–321.
[17] Kurtoglu A, Karakus V, Erkal O, *et al.* β-Thalassemia gene mutations in Antalya, Turkey: results from a single centre study. Hemoglobin. 2017;40(6):392–395.
[18] Khelil AH, Laradi S, Ferchichi S, *et al.* [Diagnostic strategy of β-thalassemic mutation in a Tunisian family, application in prenatal diagnosis]. Ann Biol Clin (Paris). 2003;61(2):229–233.
[19] Omar A, Abdel Karim E, Gendy WE, *et al.* Molecular basis of β-thalassemia in Alexandria. Egypt J Immunol. 2005;12(1): 15–24.
[20] Perrin P, Bouhassa R, Mselli L, *et al.* Diversity of sequence haplotypes associated with β-thalassaemia mutations in Algeria: implications for their origin. Gene. 1998;213(1-2):169–177.
[21] Soliman OE, Yahia S, Shouma A, *et al.* Reverse hybridization StripAssay detection of β-thalassemia mutations in northeast Egypt. Hematology. 2010;15(3):182–186.
[22] Gueye Tall F, Martin C, Malick Ndour EH, *et al.* Genetic background of the sickle cell disease pediatric population of Dakar, Senegal, and characterization of a novel frameshift β-thalassemia mutation [*HBB*: c.265_266del; p.Leu89Glufs*2]. Hemoglobin. 2017;41(2):89–95.
[23] Renoux C, Connes P, Nader E, *et al.* β-Thalassaemia promotes frequent vaso-occlusive crises in children with sickle cell anaemia through haemorheological changes. Pediatr Blood Cancer. 2017;64(8):e26455.
[24] Hafiani K, Bazoui H, El Mahdi Y, *et al.* Major sickle cell syndromes in children in Kenitra, Morocco. Asian Pac J Trop Dis. 2017;7(11):688–690.
[25] Bener A, Al-Mulla M, Clarke A. Premarital screening and genetic counseling program: studies from an endogamous population. Int J Appl Basic Med Res. 2019;9(1):20–26.
[26] Forster L, Ardakani RM, Qadah T, *et al.* The effect of nonsense mediated decay on transcriptional activity within the novel β-thalassemia mutation *HBB*: c.129delT. Hemoglobin. 2015; 39(5):334–339.
[27] Mesbah-Amroun H, Rouabhi F, Ducrocq R, *et al.* Molecular basis of β-thalassemia in Algeria. Hemoglobin. 2008;32(3): 273–278.
[28] Said F, Abdel-Salam A. XmnI polymorphism: relation to β-thalassemia phenotype and genotype in Egyptian children. Egypt J Med Hum Genet. 2015;16(2):123–127.
[29] Yang Z, Cui Q, Zhou W, *et al.* Comparison of gene mutation spectrum of thalassemia in different regions of China and Southeast Asia. Mol Genet Genomic Med. 2019;7(6):e680.